

SÉRIE A, n° 905

N° D'ORDRE : 929

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

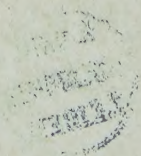
ANNE ROGER NÉE BONNET

- 1^{re} THÈSE.** — Développement tissulaire des virus du groupe
Trachome-Psittacose-Lymphogranulomatose.
- 2^e THÈSE.** — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 7 Juin 1960 devant la Commission d'examen

MM. THOMAS, *Président.*

COUTEAUX }
MAY } *Examinateurs.*



SÉRIE A, N° 905

N° D'ORDRE : 929

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

ANNIE ROGER NÉE BONNET

1^{re} THÈSE. — Développement tissulaire des virus du groupe
Trachome-Psittacose-Lymphogranulomatose.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

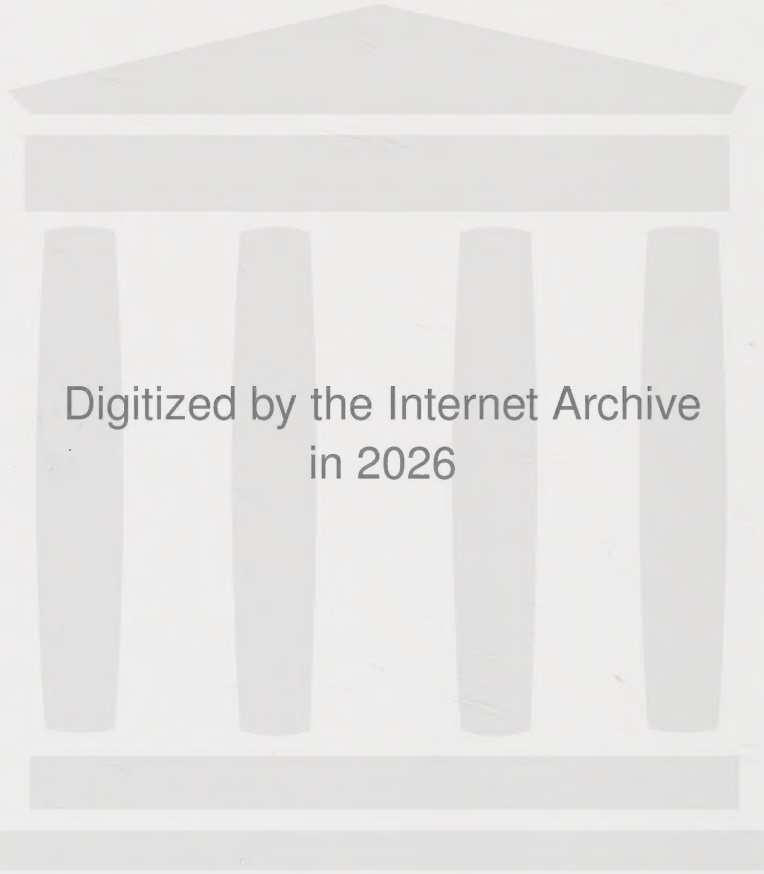
Soutenues le 7 Juin 1960 devant la Commission d'examen

MM. THOMAS, *Président.*

COUTEAUX
MAY

} *Examineurs.*





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Faculté des Sciences de l'Université de Paris

Doyen J. PÉRÈS.

PROFESSEURS

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	PONCIN	T Mécanique générale.
DE BROGLIE	T Théories physiques.	DUBREIL	T Arithmétique et théorie des nombres.
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées.	QUELET	T Chimie organique.
PÉRÈS	T Mécan. des Fluides et applications.	CAGNIARD	T Géophysique appliquée.
BARRABÉ	T Géol. struct. et Géol. appliquée.	CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.
J. BOURCART	T Géogr. physique et Géol. dynamique.	CUVILLIER	T Micropaléontologie.
PLANTEFOL	T Botanique.	JUNG	T Pétrographie.
GRASSÉ	T Evolution des êtres organisés.	TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique.
PRÉVOST	T Chimie organique.	WIEMANN	T Chimie organique et structurale.
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie.	JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	VASSY	T Physique de l'Atmosphère.
WYART	T Minéralogie.	DESTOUCHES	T Théories physiques.
TEISSIER	T Zoologie.	M. PRUVOST	T Géologie.
MANGENOT	T Biol. végétale.	AMIEL	T Chimie générale.
P. AUGER	T Physique quantique et relativité.	HOCART	T Minéralogie.
MONNIER	T Physiol. générale.	J.-P. MATHIEU	T Physique (Option) (Orsay).
PIVETEAU	T Paléontologie.	COUTEAUX	T Biol. animale (P. C. B.).
ROCARD	T Physique (E. N. S.).	MAY	T Zoologie (Orsay).
H. CARTAN	T Mathématiques (E. N. S.).	CHOQUET	T Théor. des fonct. et topologie.
LAFFITTE	T Chimie générale.	FELDMANN	T Biologie végétale marine.
FAVARD	T Géométrie supérieure.	GUINIER	T Physique des solides.
COULOMB	T Physique du Globe.	JOST	T Physiol. comparée.
Mlle COUSIN	T Biol. animale (S. P. C. N.).	FORTET	T Calcul des probabilités et physique math.
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	SCHWARTZ	T Calcul différentiel et intégral.
P. DRACH	T Zoologie.	CHOUARD	T Physiol. végétale.
KASTLER	T Physique (E. N. S.).	MALAVARD	T Aviation.
EPHROSSI	T Génétique.	BRELOT	T Calcul différentiel.
WURMSER	T Biologie physico-chimique.	NORMANT	T Synthèse organique.
RIVIÈRE	T Géologie (S. P. C. N.) Orsay.	BÉNARD	T Chimie minérale.
GAUTHIER	T Biol. végétale (P. C. B.).	BUYAT	T Botanique (E. N. S.).
LUCAS	T Recherches physiques.	DUGUÉ	T Statistiques mathém.
A. THOMAS	T Biologie cellulaire.	GELOSO	T Chimie (S. P. C. N.).
ARNULF	T Optique appliquée.	SOULAIRAC	T Psychophysiologie.
M. MORAND	T Enseignement de Physique.	ULRICH	T Physiologie végétale.
SOLEILLET	T Physique (P. C. B.).	MARÉCHAL	T Optique théorique et appliquée.
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.	KIRRMANN	T Théories chimiques.
DANJON	T Astronomie.	CHADEFAUD	T Botanique.
PETIT	T Biologie maritime.	Mlle LE BRETON	T Physiol. générale.
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique.	SALEM	T Mathématiques générales.
GALLIEN	T Embryologie.	IFLONG	T Mathématiques générales.
EICHORN	T Biologie végétale (S.P.C.N.).	DEVILLERS	T Anatomie et histologie comparée.
DE CUGNAC	T Biologie végétale (S.P.C.N.).	FHRESMANN	T Taxonomie alacébrique.
Mlle CAUCHOIS	T Chimie physique.	FRANCON	T Physique (S. P. C. N.).
THELLIER	T Physique du Globe.	GLANGEAUD	T Géogr. physique et Géol. dynamique.
L'HÉRITIER	T Génétique.	GODEMENT	T Mathématiques (M. G. P.).
GRIVET	T Radioélectricité.		

PISOT	T	Technique mathématique de la physique.	POSSOMPES	T	Zoologie.
ROCH E.	T	Géologie.	PULLMANN		Chimie théorique.
SCHATZMANN	T	Astrophysique.	TEILLAC		Physique nucléaire et Radio-activité.
TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique.	TONNELAT		Biologie physico-chimique.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.	VILLE	T	Econométrie.
LENNUIER	T	Physique (M. G. P.).	WILLEMART		Chimie (P. C. B.).
RIZET		Génétique.	DODÉ	T	Chimie (S. P. C. N.) Orsay.
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.	FREYMANN	T	Physique générale.
Mme TONNELAT	T	Relativité.	GUINOCHET	T	Biologie végétale (Orsay).
DIXMIER	T	Mathématiques (M. P. C.).	ROLLET	T	Chimie (P. C. B.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.	Mlle JOSIEN	T	Chimie (P. C. B.).
AIGRAIN	T	Electrotechnique générale.	CHEVALLEY	T	Géométrie algéb. et théorie des groupes.
BRUSSET		Chimie minérale.	ARNOULT	T	Electronique.
M. LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies.	CHAPELLE	T	Physique (M. P. C.) Orsay.
Mme CHAIX		Chimie biologique.	DELANGE	T	Mathématiques (Orsay).
Mme HUREL-PY		Biol. végétale (P. C. B.).	DENY	T	Mathématiques (M. G. P.).
PIAUX		Chimie (M. P. C.).	GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.
BRUN	T	Mécanique expérimentale des fluides.	LUCAS G.	T	Géologie.
LEDERER	T	Chimie biologique.	ALLARD		Chimie physique.
Mme DUBREIL	T	Mathématiques.	BERTHELOT		Phys. nucl. et Radioactivité.
Mme LE LONG	T	Mathématiques (E. N. S.).	BRICARD		Météorologie et Phys. de l'atmosphère.
BEILLAIR	T	Géologie (S. P. C. N.).	M ^{me} ALBE-FESSARD		Psycho-Physiol.
COTTE	T	Physique (Orsay).	FRIEDEL		Physique des Solides.
DUBOIS J. E.	T	Chimie organique.	M. JULIA		Etude des Molécules organiques complexes.
LAMOTTE		Zoologie (E. N. S.).	LENDER		Biol. animale (S. P. C. N.) Orsay.
MICHEL André	T	Chimie (S. P. C. N.).	MAGAT		Physico-chimie des Rayonn.
OLMER	T	Energétique générale.	Mlle QUINTIN	T	Electrochimie.
ROUAULT	T	Physique générale.	MONOD	T	Chimie du métabolisme.
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.	BENOIT	T	Physiologie animale.
BARCHEWITZ	T	Chimie physique.	DE POSSEL	T	Analyse numérique.
BROSSEL	T	Physique atomique.	CHARLOT	T	Chimie analytique.
BUSER		Physiol. comparée.	HAISSINSKY	T	Radiochimie.
CAMUS		Physiol. végétale (3 ^e Cycle).	LEMÉE	T	Physiologie (B. M. P. V.).
CASTAING		Physique générale.	GUÉRIN	T	Chimie (M. P. C.).
CURIEN		Minéralogie et cristallographie.			
MOYSE	T	Physiologie végétale (Orsay).			
PANNETIER		Chimie (S. P. C. N.).			

Secrétaire général C. MONIER.

... diviser chacune des difficultés que j'examinerais en autant de parcelles qu'il se pourrait et qu'il serait requis pour les mieux résoudre.

DESCARTES.

A L'INSTITUT PASTEUR

*sans lequel ce travail n'aurait pas
été possible.*

INTRODUCTION HISTORIQUE

L'étude morphologique des gros virus visibles en microscopie ordinaire a commencé en 1907 avec la description des *corps d'inclusion* du Trachome par Halberstaedter et von Prowazek (8). Pendant la phase aiguë de l'infection, les corps d'inclusion sont, en effet, directement visibles sur frottis colorés au Giemsa, soit à l'état libre, soit à l'intérieur du cytoplasme des cellules épithéliales de la conjonctive tarsale supérieure.

Dès 1909-1910, Lindner (18) entreprend une étude des éléments trachomateux qui surprend encore aujourd'hui par sa finesse et pour laquelle il utilisait des frottis colorés par le Giemsa acétique. Il a insisté longuement sur les différences de taille des particules virulentes qu'il a classées en deux catégories distinctes. Le premier groupe correspond aux particules les plus fines désignées par Herzog en 1910 (11) sous le nom désormais classique de corps élémentaires. Les éléments du second groupe, nettement plus volumineux, ont été désignés d'emblée par Lindner sous le nom de *corps initiaux*.

Lindner pensait, en effet, que ces formations apparaissaient les premières à l'intérieur des cellules parasitées et qu'elles représentaient la phase initiale de croissance et de multiplication du parasite : il introduisit ainsi le premier la notion de *cycle évolutif obligatoire* dans la multiplication du virus trachomateux.

Selon lui, on voyait d'abord apparaître un corps initial unique, ordinairement en anneau, à l'intérieur du cytoplasme de la cellule. Puis le corps initial se divisait et on assistait à la formation d'une véritable colonie de corps initiaux. La division se poursuivait encore et les corps élémentaires qui en résultaient se formaient aux dépens des corps initiaux d'abord au centre de la colonie puis à sa périphérie, de sorte que la colonie terminale ne comportait plus que des *corps élémentaires*.

Lindner, pour qui les corps initiaux constituaient donc un stade capital dans la multiplication du virus, s'attacha à les décrire avec une grande minutie et il attira l'attention sur leur variabilité morphologique (formes en anneau, éléments bipolaires ou bacilliformes, etc.).

En 1912, Halberstaedter (7) reprit de nouveau l'étude morphologique des inclusions du trachome et résumant les données acquises jusqu'alors, il fut amené à considérer chaque inclusion comme constituée en proportions relativement variables par trois structures élémentaires distinctes :

1° *Les granulations virales*, rougeâtres au Giemsa et ordinairement groupées en amas dans le cytoplasme de la cellule.

2° *Une matrice*, incolore au Giemsa mais responsable de la cohésion des particules virulentes à l'intérieur de chaque colonie.

3° *Une substance « analogue à la plastine »* qui englobait l'ensemble de la colonie et qui se présentait au Giemsa avec une teinte bleutée.

On a beaucoup écrit depuis sur le Trachome, soit pour infirmer, soit, finalement, pour confirmer le rôle pathogène des éléments de von Prowazek, Halberstaedter et Lindner mais on n'a apporté que peu d'acquisitions morphologiques nouvelles aux magistrales études de ces trois auteurs.

En 1930, la découverte indépendante et simultanée du virus de la psittacose par Levinthal (15), Coles (5) et Lillie (17) devait constituer un tournant dans l'histoire des virus visibles. Il ne s'agissait plus, en effet, cette fois d'un virus *superficiel* épithélial mais d'un virus capable de *pénétrer* à l'intérieur même de l'organisme et de parasiter les cellules du système macrophagique (système réticulo-endothélial).

En outre, le passage rapidement effectué à un animal de laboratoire rendait possible une expérimentation étendue, ce qui explique le grand nombre de travaux consacrés depuis au virus psittacotique.

Bedson et Bland (2), en 1932, inaugurèrent l'étude morphologique du virus et distinguèrent deux types nettement individualisés par des différences de taille; sans doute influencés par une réminiscence des travaux de Lindner sur le trachome, ils dénommèrent « corps élémentaires » les formes les plus petites du virus et « corps initiaux » ses aspects les plus volumineux. Cependant, à la différence de Lindner, ils ne s'attachèrent pas à décrire minutieusement la morphologie des corps initiaux et ne s'intéressèrent qu'à leur signification dans la multiplication du virus.

Comme Lindner l'avait fait, avant eux, pour le trachome, ils insistèrent sur l'existence d'un cycle évolutif qui justifiait, cette fois encore, la terminologie de « corps initiaux ». Ils furent capables, parce qu'ils disposaient d'un animal d'expérience, la souris, de démontrer nettement l'existence d'un tel cycle et d'évaluer la durée de chacune de ses phases.

Ainsi, chez la souris inoculée par voie péritonéale avec une dose massive de virus et dont ils étudièrent systématiquement les frottis de rate, ils établirent la chronologie suivante :

15^e heure, formation des « plaques » ou « plasmodes », colorées soit en bleu soit en pourpre au Giemsa.

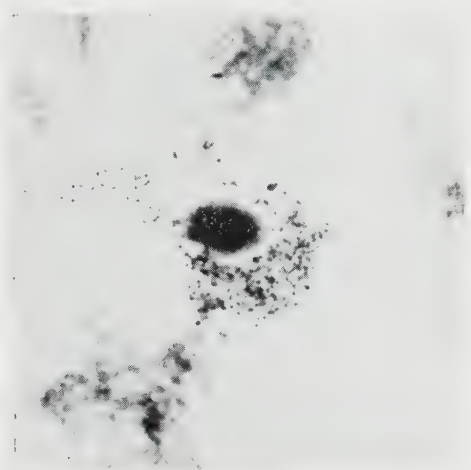


Fig. 1. — Virus d'avortement de la brebis (souche « Compiègne 56 »)
culture dans l'espace arachnoïdien du singe.

Coloration bleu de méthylène bicarbonaté isotonique

Gr. : x 1.200

(Photo. P. Manigault, Institut Pasteur.)

24^e heure, apparition des « corps d'inclusion » du virus à l'intérieur des plaques, les corps d'inclusion étant ordinairement constitués par des amas, ou « morula », d'éléments relativement volumineux, les corps initiaux.

Entre la 48^e et la 72^e heure, transformation par division des corps initiaux en corps élémentaires puis rupture cellulaire, libération des particules infectantes fondamentales (corps élémentaires).

Dès lors, la notion de cycle évolutif parut définitivement établie et s'imposa comme un caractère de base, systématiquement recherché ensuite pour tous les virus du groupe.

Ainsi, en 1934, Thygeson (28), étudiant le virus de la conjonctivite humaine à inclusions, proche du trachome mais infiniment moins pathogène, réalisait chez un individu atteint une expérience d'inoculation contro-latérale tout à fait analogue dans son

principe à celle de Bedson et Bland avec le virus psittacosique : il établissait ainsi, grâce à des frottis de la conjonctive tarsale inférieure, l'existence d'un cycle évolutif du virus dont il chiffrait la périodicité à une centaine d'heures.

Cependant, en 1935, Levinthal (16) s'inscrivait en faux contre la *théorie du cycle obligatoire* du virus de la psittacose si catégoriquement affirmé par Bedson et Bland (2) puis par Bland et Canti (4).

Pour Levinthal, s'il est bien évident que, dans les conditions d'observation de Bedson et Bland, le cycle évolutif existe, il ne s'ensuit pas nécessairement qu'il soit obligatoire.

Les corps initiaux ne se forment, en fait, dit Levinthal, que dans l'éventualité de cellules qui résistent à l'envahissement par le virus — ce qui est ordinairement le cas au début de la culture dans une cellule nouvellement parasitée; les corps élémentaires apparaissent dès que la résistance cellulaire est surmontée et si le virus envahit des cellules peu résistantes ou fragilisées, les corps élémentaires se constituent d'emblée sans qu'il y ait jamais de corps initiaux et sans qu'on puisse donc réellement parler d'un véritable cycle.

Levinthal note aussi, à côté des corps élémentaires et des corps initiaux, d'autres aspects morphologiques des virus psittacosiques tout à fait analogues aux éléments polymorphes décrits par Lindner pour le trachome (anneaux, bacilles bipolaires, etc.) mais il interprète ces morphologies comme des « formes d'involution » ou de « dégénérescence », ce qui explique, peut-être, qu'elles aient été pratiquement oubliées par la suite.

L'année 1935 devait aussi être marquée par la découverte de Miyagawa et coll. (22) qui décrivirent les « granulo-corpuscules » ou corps élémentaires de la maladie de Nicolas-Favre (ou Lymphogranulomatose vénérienne).

En 1938, Findlay, Mackenzie et Mac Callum (6) décrivaient le cycle évolutif de ce quatrième virus, observé sur des frottis de cerveaux de souris inoculés par voie intracrânienne. Ils concluaient à de très grandes analogies avec le cycle du virus de la psittacose.

Depuis cette date, des virus nouveaux et nombreux sont venus démontrer l'importance du groupe des gros virus visibles, désormais connu sous le nom de groupe Trachome-Psittacose-Lymphogranulomatose (T. P. L.).

En même temps, les méthodes sérologiques, en particulier la fixation du complément entre les mains de Eaton, Martin et Beck en 1942, fondaient sur des bases antigéniques solides une unité jusque là purement morphologique.

Cependant, malgré l'étude de virus nouveaux, il n'y a eu que peu de modifications dans nos connaissances morphologiques.

Certes, on a pu évaluer à 400 m μ environ le diamètre des corps élémentaires en se servant du microscope électronique (Kurotchkin et coll. (12), 1947) et confirmer ainsi les mesures microphotographiques de Lazarus et Meyer en 1939 (13). Certes, le microscope électronique a permis aussi de mettre en évidence une structure interne des corps élémentaires avec une membrane cellulaire entourant une masse protoplasmique centrale. Mais les études récentes sur le développement des virus T. P. L. comme celles de Yanamura et Meyer (32), en 1941, avec le virus de la psittacose, celles de Rake et Jones (24), en 1942, sur le virus de la lymphogranulomatose ou encore les travaux de Weiss (30), en 1949, n'ont fait que confirmer la notion d'un cycle évolutif obligatoire identique pour tous les virus du groupe.

(Planche I, page 100.)

PREMIERE PARTIE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A) LES SOUCHES

Pour nous faire une idée d'ensemble sur la morphologie des virus T. P. L., nous avons tenu à étudier un nombre suffisant de souches choisies de façon à grouper dans notre échantillonnage les types individuels les plus représentatifs.

Avec le *Trachome*, nous nous sommes bornée à étudier des frottis nombreux en provenance d'Afrique du Nord (Algérie, Tunisie ou Maroc) et d'Iran. Ce virus est, en effet, trop rare en France pour que nous ayons pu le rechercher nous-même au niveau de l'œil des Trachomateux.

Les autres souches ont, au contraire, fait l'objet d'une expérimentation étendue. Nous en avons étudié 8 : une seule était d'origine humaine : la souche classique « Kam » de lymphogranulomatoase vénérienne. Les 7 suivantes provenaient d'animaux spontanément infectés. Elles ont été isolées de mammifères (1 souche de pneumonie de la souris; 3 souches d'avortement de la brebis) ou d'oiseaux (2 souches typiques de psittacose et 1 souche à caractère ornithosique mais isolée, elle aussi, du perroquet).

Ces 8 souches, régulièrement entretenues et conservées au laboratoire possédaient en commun les propriétés biologiques fondamentales qui permettent de définir le groupe psittacose-lymphogranulomatoase du triple point de vue *du pouvoir pathogène expérimental, des particularités morphologiques et des caractères sérologiques*. Elles se multiplient, en effet, activement dans le poumon de souris inoculées par voie nasale; elles réagissent uniformément de façon croisée en fixation du complément; elles ont, enfin, un polymorphisme apparent qui leur est propre et derrière lequel on retrouve un ensemble de figures absolument homogène.

Nous ne nous sommes pourtant pas contentée de vérifier personnellement l'identité globale des souches étudiées ni de les caractériser, comme on le fait souvent, par *leur provenance*; nous avons aussi voulu pénétrer plus avant leurs caractères biologiques individuels de façon à en tenir compte, en cas de nécessité, dans l'interprétation des observations microscopiques.

Nous avons ainsi été amenée à accorder toute notre attention à deux ordres de *critères différentiels* d'une grande importance : la *virulence* et la *toxicité* propres des souches.

Virulence : on peut dire qu'une souche du groupe psittacose-lymphogranulomatose est d'autant plus virulente que son « spectre pathogène » est plus étendu.

On peut donc envisager la virulence comme le contrepied exact de la *spécificité de tissu* : une souche virulente est, en effet, capable d'envahir un très grand nombre de tissus divers tandis qu'une souche étroitement spécifique se caractérise par une virulence restreinte à un type particulier de cellules.

En pratique, avec le groupe psittacose-lymphogranulomatose, trois modes d'inoculation permettent de se faire une idée précise et rapide du niveau spécifique de virulence : l'inoculation dans le péritoine de la souris, l'inoculation intra-arachnoïdienne, également chez la souris, et l'inoculation dans le sac allantoïque de l'œuf de poule.

Les souches de virulence élevée se multiplient en effet activement dans les trois cas : c'est ce que l'on observe avec les souches typiques de psittacose. Les souches de virulence faible ne se multiplient régulièrement que dans le cerveau de la souris où elles conduisent d'ailleurs fréquemment à une maladie chronique avec hydrocéphalie tout à fait caractéristique : on trouve dans ce groupe les souches de lymphogranulomatose humaine et les souches d'avortement des ovins.

Les souches de virulence intermédiaire ont un pouvoir pathogène irrégulier dans le péritoine de la souris ; elles ne dépassent guère le stade de multiplication intra-cellulaire dans la membrane allantoïque, mais elles tuent assez rapidement la souris par inoculation intra-arachnoïdienne.

La *toxicité* des souches se dissocie nettement de leur virulence, quel que soit d'ailleurs le mode de toxicité envisagé.

La « toxicité globale » est celle qu'on apprécie ordinairement par inoculation intra-veineuse chez la souris : elle s'observe avec toutes les souches du groupe psittacose-lymphogranulomatose, virulentes ou non, à condition d'utiliser toujours des quantités énormes de virus.

Pour notre part, nous attacherons plus d'importance ici à la « toxicité spécifique » que nous avons pris l'habitude d'apprécier sur œuf embryonné et qui peut se rencontrer avec certaines souches de virulence forte ou avec des souches de virulence amoindrie sans être aucunement l'apanage de l'un ou l'autre des trois groupes.

Trois modes d'inoculation principaux nous ont servi d'abord pour la détermination de la toxicité spécifique : l'inoculation dans le sac allantoïque de l'œuf, l'inoculation sur la membrane choriale et l'inoculation dans le sac vitellin. Puis nous nous sommes aperçue de l'intérêt très inégal des trois types d'épreuve que l'on peut ranger dans l'ordre suivant par sensibilité décroissante :

sac vitellin — membrane chorale — sac allantoïque.

Nous n'avons donc plus finalement conservé comme procédé standard que la seule inoculation vitelline avec ses deux variantes possibles : celle de la « toxicité spécifique initiale » où l'on étudie la mortalité des œufs pendant les 48 premières heures qui suivent leur inoculation et où il faut employer des quantités de virus relativement importantes; et celle de la « toxicité spécifique retardée » où l'on peut employer des quantités de virus beaucoup plus faibles et où la mortalité survient seulement au début de la culture qu'elle arrête (du fait de la mort de l'œuf) au 4^e ou 5^e jour.

Deux de nos souches avaient ainsi une toxicité spécifique élevée : une souche typique de psittacose (souche Bordeaux 56) et une souche à caractères ornithosiques (souche Larufa).

SOUCHES	IDENTITÉ	TOXICITÉ	CULTURE			VIRULENCE
			Sac allant.	Ip. souris	Ic. souris	
Bordeaux 56	Psittacose	+++	+++++	+++++	+++++	Élevée
Weaver Ageon	Psittacose	+	+++++	+++++	+++++	Élevée
Larufa	Ornithose	+++++	+ (épith.)	±	++	Moyenne
Mooser	Pneumonie (souris)	+	+ (épith.)	±	++	Moyenne
Kam	Lymphogranulomatose vénérienne	+	±	O	+ (chron.)	Faible
Avortement (1)	Avortement (brebis)	+	±	O	+ (chron.)	Faible

TABLEAU I. — Caractères différentiels des souches étudiées

(1) 2 souches de notre laboratoire (parmi de nombreuses autres) : souche « Faye-Simon » et souche « Compiègne 56 », et 1 souche écossaise de Mac Ewen.

B) PROCÉDES DE CULTURE DES VIRUS

Les virus T. P. L. sont des parasites obligatoires des cellules vivantes et plus particulièrement de leur cytoplasme, toutes les cultures ont donc été réalisées sur des tissus sensibles.

En raison de la grande variété des conditions réalisables *in vivo*, nous avons préféré les procédés qui permettent de travailler *directement* sur des cellules « en place ». Les résultats obtenus jusqu'ici sont, en effet, beaucoup plus uniformes dans les cultures artificielles de tissus sensibles et ne permettent pas de se rendre compte aussi nettement des potentialités évolutives extraordinaires des gros virus.

Nous n'exposerons ici que les techniques les plus usuelles afin de ne pas surcharger inutilement cet exposé et nous nous bornerons à six procédés d'inoculation de base : trois d'entre eux font appel à la souris et les trois autres aux œufs embryonnés.

INOCULUM.

La plupart des passages ont été effectués aux dépens de membranes vitellines ou de poumons de souris, c'est-à-dire dans des conditions où nous avons toujours obtenu un grand nombre de corps élémentaires.

Chaque fois que nous avons employé un autre matériel infectant, nous l'avons mentionné dans la suite de cet exposé.

Nous avons broyé ordinairement les organes infectés au broyeur de verre de Durand avec 0,5 cm³ de sable de Fontainebleau stérile. Les suspensions mères d'organes ont toujours été réalisées en portant le broyat dans 10 cm³ d'eau physiologique stérile (suspension dite au 1/10). Lorsque nous avons voulu utiliser des quantités plus faibles (notamment pour apprécier le titre limite infectant d'un virus), nous avons pratiqué des dilutions selon une progression géométrique (10¹, 10², etc.); dans ces conditions, le titre infectant des membranes vitellines ou des poumons de souris évoluait entre 10⁶ et 10⁸ pour les souches les plus virulentes (on doit, en effet, noter que la relation entre le titre infectant des souches et le nombre des particules de virus est tout à fait *variable* selon la virulence de la souche; les souches de virulence faible n'atteignent un titre élevé que dans des tissus étroitement spécifiques).

Nous avons toujours dégrossi les suspensions 10¹ pour en éliminer les débris tissulaires (d'abord par simple sédimentation du sable de Fontainebleau qui entraîne les plus gros débris puis par centrifugation lente à 1.000 g. pendant 10 minutes).

TECHNIQUES DES INOCULATIONS ET DES AUTOPSIES.

1° *Inoculation intra-nasale chez la souris.* Toute la manipulation est extrêmement dangereuse pour l'expérimentateur lorsqu'elle s'effectue à l'air libre. On doit donc la pratiquer dans une hotte d'Armand Delille maintenue en dépression par un système d'aspiration à air filtré : l'air extérieur pénètre ainsi de façon continue dans la hotte tandis que l'air intérieur ne peut sortir qu'en traversant un système de stérilisation efficace.

Il arrive, en effet, très souvent avec cette technique que la souris « fasse des bulles » et réalise ainsi un véritable aérosol de virus.

La hotte doit être munie d'un dispositif à UV qui servira à la stérilisation de l'air intérieur après inoculation; elle comporte aussi obligatoirement des manchettes plastiques qui vont enserrer le poignet ganté de l'opérateur. L'inoculation doit, en effet, être effectuée avec des gants de caoutchouc qui seront désinfectés à l'alcool avant d'être retirés de la hotte et qui seront ensuite plongés dans de l'eau de Javel diluée.

Inoculation. On place une à une les souris à inoculer dans un petit bocal de 250 cm³ contenant un coton largement imbibé d'éther et fermé par un couvercle amovible. Dès que la souris tombe sur le côté et que ses réflexes ont disparu, l'inoculation commence : on laisse pour cela tomber goutte à goutte le liquide à inoculer sur les narines de l'animal qui les aspire directement dans son appareil respiratoire mais qui ne doit jamais les déglutir : si cette éventualité se présente, c'est que l'anesthésie est insuffisante. La seringue la plus commode est une seringue de 2 cm³, munie d'une aiguille de 20,8/10.

Dès que les souris sont inoculées, on les place dans des bocal à saigner de deux litres recouverts par un couvercle grillagé (sans qu'il y ait jamais plus de deux souris par bocal).

On laisse ensuite les souris pendant 20 minutes sous UV à l'intérieur de la hotte d'Armand Delille.

Autopsies. Un point particulièrement intéressant réside dans la perfection de la saignée (règle d'ailleurs valable pour toutes les autopsies) : un animal insuffisamment saigné permet seulement d'obtenir des frottis de sang et non de véritables frottis d'organes. Pour saigner parfaitement les souris, on les anesthésie au chloroforme puis on ouvre les carotides aux ciseaux.

On ouvre la peau aux ciseaux également : on pratique une incision bilatérale tout le long du tronc puis une incision qui va de l'une à l'autre des aines. On récline la peau de bas en haut en l'enroulant (« comme si on ouvrait une boîte de sardines ») sur une pince de Péan : on dégage ainsi un plan mus-

culo-osseux stérile. On sectionne les cartilages costaux (en changeant de ciseaux) et on coupe le sternum juste au-dessus du diaphragme : le volet sternal se relève alors spontanément, tiré vers le haut par les muscles pectoraux qu'il faut prendre bien soin de ne pas sectionner.

On prélève séparément chaque poumon en coupant la bronche et on effectue les frottis avec un fragment de l'organe. Pour cela, on éponge d'abord soigneusement au papier buvard, afin d'éliminer le plus possible ce qui reste de sang, puis on écrase le fragment sur les lames *en tournant* sur elle-même la pince qui le tient de façon à exprimer le contenu des alvéoles.

Les frottis de poumon de souris se colorent remarquablement bien, sans qu'il y ait aucune tendance à l'empâtement.

2° *Inoculation dans le péritoine de la souris.* On l'effectue en deux temps pour créer une chicane qui évite le reflux du liquide inoculé. On perfore donc la peau préalablement désinfectée à l'alcool iodé (flanc droit), on fait un court trajet sous-cutané, puis on traverse le plan musculaire abdominal et on inocule 0,2 cm³.

Pour l'autopsie, on récline la peau de haut en bas (toujours dans le but de créer un plan stérile) et on ouvre l'abdomen sur la ligne médiane.

On doit effectuer les frottis de péritoine par raclage au scalpel de la paroi et non par apposition sur les anses intestinales.

Il faudra toujours utiliser ici un colorant plus dilué ou raccourcir les temps de coloration car le liquide péritonéal favorise puissamment cette coloration.

Avec les appositions de rate, souvent intéressantes avec le groupe psittacose-lymphogranulomatose, et que l'on doit effectuer après avoir soigneusement épongé la surface de section sur un papier buvard, il faut, au contraire, surcolorer nettement (la rate est, en effet, un des organes les plus difficilement colorables).

3° *Inoculation dans l'espace arachnoïdien chez la souris.* On anesthésie d'abord la souris à l'éther. On désinfecte rapidement la peau à l'alcool iodé au niveau de la convexité d'un pariétal puis on perfore la peau et la voûte osseuse avec une aiguille très fine à biseau très court, montée sur une seringue au centième. Pour cette opération, nous avons toujours employé des seringues montées sur un appareil à inoculation muni d'un mouvement microscopique à crémaillère qui permet de ne pas pénétrer trop profondément dans le tissu cérébral.

Autopsie. On désinfecte la peau du crâne à l'alcool iodé et

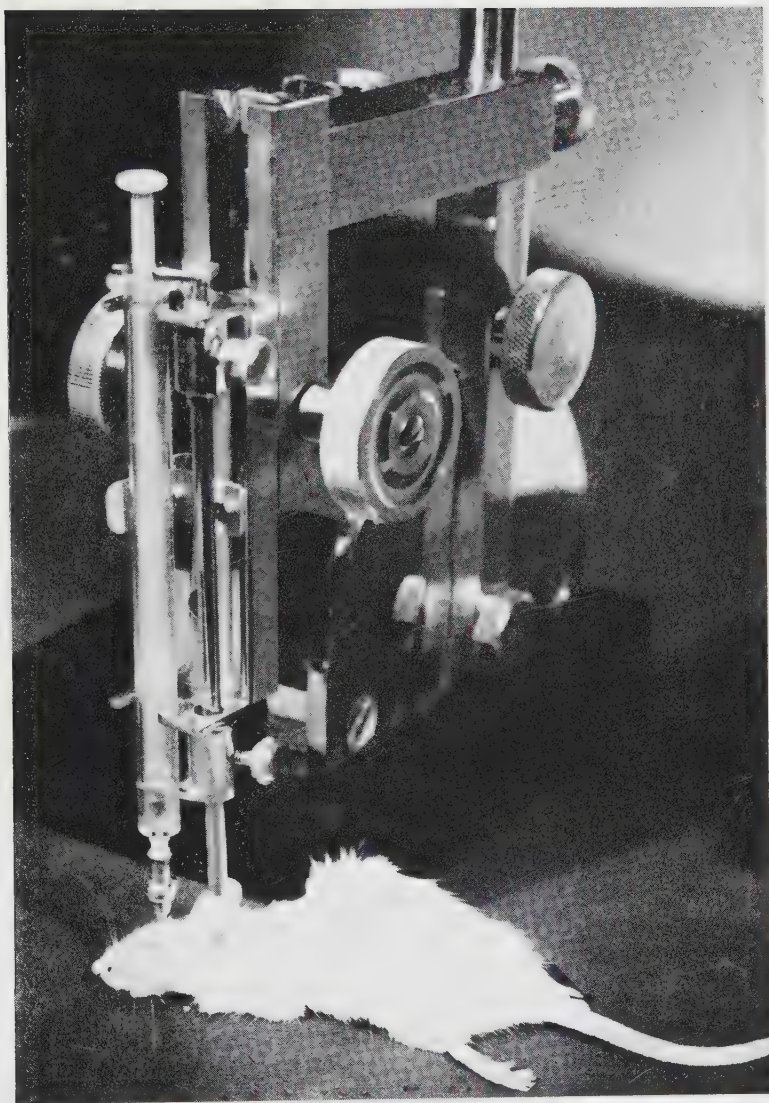


Fig. 2. — Inoculation intra-arachnoïdienne chez la souris

on dénude la surface osseuse. Nouvelle désinfection de la voûte puis ouverture aux ciseaux : pour cela, on sectionne l'os en dedans des cavités orbitaires et des oreilles. On soulève le volet osseux et on effectue aussitôt les frottis d'arachnoïde par simple apposition sur la convexité cérébrale (la dure-mère se détache en effet constamment avec le volet auquel elle adhère chez la souris).

Chaque lame doit correspondre à une surface d'application distincte car la mince couche cellulo-liquidienne s'épuise très vite. Il importe aussi de ne pas appuyer trop fortement sur la masse cérébrale pour éviter de faire des frottis de substance nerveuse, sans intérêt avec le groupe psittacose-lymphogranulomateuse.

4° *Inoculation dans le sac vitellin de l'œuf.* L'inoculation s'effectue après 6 jours d'incubation à 38° C (humidité de 80 %). Pendant cette période d'incubation, on doit retourner les œufs chaque jour afin d'éviter l'adhérence des embryons à la partie supérieure de la coquille car l'embryon flotte sur l'œuf.

Pendant les 24 heures qui précèdent leur inoculation, les œufs doivent être disposés à plat afin d'éviter d'embrocher l'embryon lors des injections.

On perfore les coquilles des œufs que l'on a reconnus vivants (par transillumination) après les avoir soigneusement désinfectées à l'alcool iodé : le point de perforation correspond exactement au pôle le plus volumineux de l'œuf. On enfonce alors l'aiguille de 25,10/10 qui sert à l'injection en suivant le grand axe de l'œuf et on inocule 0,2 cm³. On désinfecte à nouveau et on recouvre de paraffine fondue.

Autopsie. Après désinfection selon le processus usuel, on découpe la coquille aux ciseaux tout autour de la poche à air, on récline la membrane inerte qui tapisse le sac allantoïque et on vide l'œuf dans une boîte de Pétri.

On recueille par dissection la membrane vitelline et on éponge un fragment sur papier buvard; on effectue alors les frottis par un mouvement circulaire.

Les frottis de sac du jaune se colorent très bien.

5° *Sac allantoïque de l'œuf.* On incube dans les mêmes conditions que précédemment mais pendant 8 jours.

Les dernières 24 heures, l'œuf est placé *verticalement*, pôle volumineux en haut.

Inoculation. On perce deux trous dans la coquille : un au niveau du pôle postérieur (pour éviter une surpression avec reflux du liquide lors de l'inoculation) et l'autre au point d'inoculation que nous choisissons généralement entre deux vaisseaux, juste au-dessus de l'embryon.

L'injection se fait aussi par une technique « aveugle » mais le succès en est assuré comme dans le cas du sac du jaune dans 100 % des cas.

On emploie une aiguille de 10,8/10 à biseau court et on la dirige directement vers l'embryon. L'aiguille perce le feuillet externe du sac allantoïque et reste ensuite dans la cavité où l'on inocule 0,2 cm³.

On rebouche les deux trous à la paraffine fondue.

Autopsie. Si on désire prélever le liquide allantoïque, l'incubation seconde s'effectue verticalement et on laisse les œufs à + 4° C pendant les 24 heures qui précèdent l'autopsie (on évite ainsi la présence de globules rouges dans le liquide). On ouvre la coquille au pôle volumineux de l'œuf, on écarte la membrane inerte qui tapisse la chorio-allantoïde, puis on perce celle-ci avec l'extrémité d'une pipette à boule et on aspire le liquide (10 cm³ parfois).

Si on veut effectuer simplement des frottis de membrane, on effectue l'autopsie comme pour le jaune mais en disséquant le sac allantoïque qu'on prélève. On fait les frottis avec un fragment du sac mais de façon assez brutale pour obtenir sur les lames des débris épithéliaux (la membrane du sac est relativement solide).

6° *Membrane chorale de l'œuf.* — *Inoculation.* Les œufs subissent aussi une incubation préalable de 8 jours à 38° C (24 dernières heures à plat). On désinfecte la coquille à l'alcool iodé au-dessus de l'embryon et au pôle postérieur de l'œuf (gros bout), on perce le pôle postérieur et on découpe un V à la scie au-dessus de l'embryon mais sans entamer la membrane coquillière. On soulève la pointe du V avec une aiguille lancéolée stérile, on enlève le fragment de coquille ainsi décollé et on découvre de la sorte une surface stérile (membre coquillière).

On accroche tangentiellement la membrane inerte pour y pratiquer une solution de continuité mais sans déchirer la membrane chorio-allantoïde qui se trouve au-dessous, on dépose sur l'orifice de la membrane coquillière les 10 gouttes de liquide à inoculer. Après chaque goutte, on aspire au pôle postérieur de l'œuf de façon à faire pénétrer le liquide entre la membrane coquillière et épithélium chorial.

On désinfecte à nouveau à l'alcool iodé, on rebouche le trou



Fig. 3. — Inoculation sur l'épithélium choïal de l'œuf de poule

du pôle postérieur de l'œuf à la paraffine et on obture l'orifice triangulaire avec un collant de cellophane.

Autopsie. Même technique que pour les frottis d'allantoïde. On prendra seulement grand soin de n'effectuer les frottis qu'avec un fragment d'épithélium correspondant au point d'inoculation.

C) TECHNIQUES DE MICROSCOPIE

1° *Préparations.* Nous n'avons pas eu recours aux méthodes histologiques en raison de l'épaisseur des coupes qui rend impossible l'étude cytologique précise des gros virus

Nous n'avons donc utilisé que des frottis ou des appositions suffisamment minces pour être parfaitement colorés et pour permettre l'examen individuel des particules de virus.

Pour chaque procédé de culture, nous avons déjà précisé le détail des techniques utilisées; nous n'y reviendrons donc pas mais nous dirons un mot du dispositif optique indispensable avant d'insister plus longuement sur les procédés de coloration.

2° *Caractéristiques du microscope utilisé.* L'optique indispensable pour la cytologie des virus du groupe T. P. L. doit répondre à des conditions précises dues à la grande finesse des éléments à observer.

Le microscope doit comporter un éclairage relativement puissant, réglable à tout moment selon le principe de Köhler. Il est donc préférable d'employer un condensateur pancratique achromatique et aplanétique, susceptible d'être immergé et dont l'ouverture numérique, variable de façon continue, doit pouvoir égaler, à son maximum, celle des objectifs à immersion. Ce condensateur doit permettre, non seulement l'observation en lumière transmise selon les principes de la microscopie ordinaire, mais encore, grâce à un diaphragme annulaire interposable dans le plan focal antérieur du condensateur en éclairage conique ou oblique, au fond noir et au contraste de phase.

Les deux combinaisons qui nous ont rendu les plus grands services utilisaient toutes deux des objectifs à immersion à huile mais ne dépassaient pas un grossissement final de 500 D.

La première nous a, surtout, servi au fond noir et en microscopie ordinaire (objectif à la fluorine, O.N. = 1,50; G. = 50 x oculaires compensateurs, G. = 10 x); la seconde ayant été employée, principalement, pour les observations en contraste de phase (obj., O.N. = 1,25, G. = 85 x; oc. comp., G. = 6 x).

Nous insistons sur l'intérêt de ces deux combinaisons pour l'étude des gros virus et tout particulièrement sur celle que nous avons utilisée avec les préparations colorées : *un grossissement final plus faible ne permet pas, en effet, l'observation des structures tandis qu'un grossissement plus élevé fait perdre beaucoup sur la netteté des couleurs.*

Pour chaque préparation, il est indispensable de vérifier le centrage du microscope et l'élimination de toute lumière parasite (compte tenu de l'épaisseur des lames porte-objet). Cela nous a été possible par l'intermédiaire d'une lentille d'Amici-Bertrand amovible, interposable sur le trajet des rayons lumineux entre les objectifs et la tête binoculaire, et qui permettait l'observation directe de l'image du diaphragme de champ dans le plan focal postérieur de l'objectif.

Ces précautions nous ont permis une très bonne observation, les images étant tout particulièrement dépourvues de halo périphérique lors des observations en microscopie ordinaire.

3° *Procédés de coloration.* Les éosinates de bleu de méthylène polychrome, encore appelés « colorants neutres », constituent les véritables colorants cytologiques des virus du groupe T. P. L.

Nous en avons utilisé de nombreux types, appartenant à de nombreuses marques, et nous avons essayé de nombreuses techniques avant de nous arrêter au colorant de Wright (marque R. A. L.) et aux procédés de coloration que nous décrirons ici qui ont été mis soigneusement au point pour ce travail et ont constitué, par conséquent, *la première étape de nos recherches* (37) (43).

a) PRÉPARATION DES SOLUTIONS DE COLORANT.

Préparation des solutions-mères. La coloration par les éosinates ne conduit à des résultats satisfaisants qu'en présence d'une certaine concentration en bleu de méthylène libre, une concentration insuffisante ne permettant pas la coloration, une concentration trop élevée conduisant, au contraire à un empâtement des structures incompatibles avec les études de cytologie (23).

Nous avons donc préparé, à côté de la solution de colorant de Wright, une solution de bleu de méthylène destinée au contrôle de la teneur en bleu des solutions finales extemporanées.

Solution de bleu de méthylène

Bleu de méthylène	1 g.
Eau bidistillée	100 ml.

Bien dissoudre le colorant au mortier, filtrer sur papier buvard et conserver en flacon fermé.

Solution de colorant de Wright

Colorant de Wright 1 g.
Alcool méthylique 100 ml.

Dissoudre également au mortier, laisser ensuite 2 heures à 37° et stocker en flacon hermétiquement clos.

*Préparation de la solution diluée
pour coloration extemporanée*

Dans une éprouvette contenant 10 ml. d'eau bidistillée, ajouter :

Alcool méthylique X gouttes
Bleu de méthylène à 1 % 1 goutte
Colorant de Wright X gouttes

Agiter l'éprouvette pendant addition du colorant de Wright (afin d'éviter la précipitation qui se produirait en surface du fait de la trop grande concentration).

Verser aussitôt sur les lames préalablement fixées (voir ci-dessous) et laisser jusqu'au début de la précipitation (5 à 10 minutes).

Laver à l'eau du robinet (alcaline à Paris) et sécher.

S'il se produit un précipité de colorant gênant à l'examen microscopique, nettoyer la lame au xylol, laver rapidement à l'alcool absolu puis à l'eau pour arrêter la décoloration : on se débarrasse facilement ainsi du précipité sans décolorer les cellules ni les particules de virus.

b) UTILISATION DE LA SOLUTION EXTEMPORANÉE DE COLORANT.

Selon le traitement préalable des frottis, on peut distinguer deux types principaux de coloration :

— l'un a une signification *topographique* et met simplement en évidence un certain nombre de structures;

— l'autre possède un caractère véritablement *cytochimique* et permet la caractérisation des substances étudiées.

PROCÉDÉS TOPOGRAPHIQUES SIMPLES. Ils sont également au nombre de deux et permettent la démonstration de structures anatomiques distinctes :

1° *Coloration après fixation par l'alcool méthylique (procédé A).*

C'est le procédé qui se rapproche le plus par ses résultats de

ceux obtenus avec les techniques usuelles du « May-Grüwald-Giemsa ».

La coloration doit être faite sur des frottis particulièrement minces car elle est d'autant plus intense que le frottis est moins épais.

On fixe par l'alcool méthylique (1 minute), l'alcool étant versé sur le frottis préalablement séché à l'air. Après rejet du fixateur, on laisse à nouveau sécher la préparation avant de la recouvrir par la solution colorante extemporanée.

2° Coloration sans fixation méthylique mais après mordantage par le bleu de méthylène (procédé R).

On recouvre les frottis simplement séchés par quelques gouttes de la solution de bleu de méthylène à 1 %. On rejette aussitôt le colorant dont l'action est immédiate puis, sans laver, on recouvre à nouveau par la solution extemporanée d'éosinate enrichie en bleu de méthylène.

RÉSULTATS

Pour bien saisir la signification « anatomique » des deux techniques précédentes, il est indispensable de connaître d'abord les résultats obtenus avec les autres types de microorganismes; il nous faut donc dire maintenant quelques mots de la coloration de quelques rickettsies et de la coloration des bactéries.

1° Coloration des microorganismes du groupe de la péripneumonie.

Nous prendrons pour type le microorganisme décrit par Herzberg en 1940 (10) et qui est responsable d'une broncho-pneumonie de la souris transmissible en série par voie nasale à partir des broyats d'organe après anesthésie à l'éther de l'animal.

Les frottis de poumons infectés sont, en effet, particulièrement démonstratifs et donnent des résultats bien supérieurs à ceux ordinairement obtenus en partant des milieux liquides ou solides de culture.

Après fixation alcoolique (procédé A), on observe une coloration des germes électivement « périphérique » et qui permet d'apercevoir les formes les plus caractéristiques : en anneau, en raquette ou en étoile à centre clair. On trouve aussi toujours de véritables corps élémentaires assez voisins de ceux de la psittacose et des filaments très fins, centrés ou non par un corps élémentaire.

Par le procédé R (sans fixation alcoolique mais avec mordantage au bleu), la coloration périphérique ne s'effectue pas et le polymorphisme des frottis fait totalement défaut.

On obtient, en effet, la seule coloration des *granules* quelles que soient par ailleurs leurs caractéristiques avec la technique précédente.

2° Coloration des Rickettsies dans les frottis de poumon de souris (*R.prowazeki*, *R.mooseri*, *R.tsutsugamuchi*).

Les résultats obtenus avec le *procédé A* confirment les données précédentes : on obtient, en effet, aussi une coloration périphérique associée à la mise en évidence de granules chromatiques à disposition bipolaire tout à fait caractéristique, la teinte périphérique étant violet-bleu et la coloration des granules, de beaucoup la plus intense, violet-rougeâtre.

La technique R, sans fixation alcoolique, ne permet de colorer aucune des formations précédentes mais teinte uniformément les germes en violet en faisant totalement disparaître l'espace clair central du *procédé A*.

3° Coloration des bactéries.

Nombre de bactéries *Gram-négatives* se colorent comme les germes précédents avec le *procédé R* ou avec le *procédé A*, la seule différence étant, avec la technique *A*, une plus grande affinité générale pour la composante bleue, les granules chromatiques se présentant avec une teinte violette intense à l'intérieur du germe uniformément bleuté.

Pour les bactéries à *Gram-positif*, la structure centrale est toujours masquée, même avec le *procédé A*, par suite de l'hypercolorabilité corticale bien connue des germes de ce groupe. Les anthracomorphes, par exemple, prennent ainsi une colorabilité intense, diffuse et violette, qui leur confère l'aspect bien connu des « bacilles bambous ».

DISCUSSION

Le procédé A où la coloration proprement dite est précédée par une fixation à l'alcool méthylique met donc en évidence deux catégories de formation : *des granules chromatiques* et une formation périphérique qui ne peut être que la *membrane cytoplasmique* des germes puisqu'elle existe même dans le groupe des péripneumonies, bien connu pour son absence de paroi cellulaire propre.

Le procédé R, avec mordantage au bleu de méthylène, s'adresse, au contraire, à la *masse protoplasmique* des éléments et ne colore électivement aucune des deux formations si bien démontrées par la précédente technique.

PROCÉDÉS CYTOCHIMIQUES.

Les procédés que nous avons utilisés visaient essentiellement à caractériser les acides nucléiques des virus du groupe T.P.L.

Il y avait à cela trois raisons principales :

— d'abord l'importance désormais bien connue des acides nucléiques dans les phénomènes du métabolisme cellulaire et de la reproduction;

— ensuite, la relation bien établie entre la coloration des microorganismes et leur teneur en acides nucléiques (ceux-ci correspondant à la plus grande partie des substances acides macromoléculaires susceptibles de se combiner avec les colorants basiques);

— enfin, la démonstration déjà ancienne et répétée à plusieurs reprises (notamment par P. Lépine et V. Sautter en France) de la nature désoxyribonucléique et Feulgen-positive des corps élémentaires des gros virus.

Nous n'avons cependant pas employé le procédé de Feulgen pas plus que la technique au vert de méthyle-pyronine, malgré leur grand intérêt en cytologie cellulaire, en raison du peu de netteté des résultats ainsi obtenus jusqu'à ce jour en microbiologie.

Il nous a, en revanche, paru logique de nous adresser à deux méthodes déjà éprouvées au cours des études sur les bactéries : le test de Brachet à la ribonucléase et l'hydrolyse acide selon le procédé de Piékariski-Robinow.

Ces techniques cherchent à caractériser les deux types d'acides nucléiques en se basant sur la persistance ou, au contraire, sur la disparition de leur colorabilité.

Le procédé de Piékariski-Robinow assure ainsi la *conservation spécifique* des acides désoxyribonucléiques qui sont extrêmement résistants à l'hydrolyse tandis que le test de Brachet rend possible l'*élimination spécifique* des acides ribonucléiques qui sont rapidement dépolymérisés par l'enzyme et deviennent ainsi immédiatement diffusibles et dialysables.

Les variantes utilisées dans ce travail présentent d'assez grandes analogies techniques entre elles (traitement initial par des solutions amenées à 60° C, utilisation finale du liquide de Wright).

Différents types de colorants basiques sont, en effet, utilisables (le bleu de méthylène par exemple) mais nous avons préféré nous en tenir au colorant de Wright dont les résultats sont particulièrement nets et démonstratifs aussi bien avec le test de Brachet qu'avec la technique de Piékariski-Robinow. Nous avons ainsi obtenu une plus grande homogénéité des résultats puisque

le colorant de Wright était également employé pour toutes les études topographiques.

1° Technique du test de Brachet modifié.

Les frottis, simplement séchés à l'air, sont ensuite fixés par le formol salé neutralisé (à 10 % de formol) (1) puis portés dans une solution de Ribonucléase à 1/10.000 dans l'eau chlorurée isotonique (à 8,5 g. %) (la solution ayant été préalablement maintenue pendant 10 minutes à 60° C afin d'obtenir une bonne spécificité de la préparation enzymatique, les autres diastases se trouvant détruites à cette température).

On laisse les préparations pendant des temps variables dans la solution de Ribonucléase (30 secondes, 1 minute, 2 minutes, 4 minutes), toujours maintenue à 60° C. On lave alors rapidement à l'eau physiologique, on laisse sécher et on colore avec la solution usuelle extemporanée d'éosinate.

Des lames-témoins sont simultanément traitées par l'eau physiologique à 60° C pendant des temps identiques : elles sont également colorées au Wright et examinées par comparaison.

RÉSULTATS

Les cellules que nous avons prises pour test (cellules souches sanguines de la membrane vitelline de l'œuf de poule) et dont le cytoplasme est abondamment chargé d'acides ribonucléiques ont totalement perdu leur basophilie extra-nucléaire après un séjour de une minute dans la solution de Ribonucléase : elles conservent, au contraire inchangée la colorabilité de leur chromatine nucléaire. Les cellules simplement traitées à l'eau physiologique gardent, au contraire, intacte, dans les mêmes conditions, leur basophilie cytoplasmique originelle.

Des entérobactéries conservent aussi leur seule colorabilité nucléaire après action de l'enzyme, leur cytoplasme demeurant, en revanche, bleuté dans les préparations-témoins.

2° Technique du test de PiékarSKI-Robinow.

Les frottis peuvent être indifféremment fixés par l'alcool méthylique ou le formol salé neutralisé.

(1) La fixation par le formol nous a paru bien supérieure à la fixation par l'alcool méthylique pour le test de Brachet : elle diminue, en effet, beaucoup la solubilité des acides nucléiques dans l'eau physiologique à 60.

A titre d'exemple, une cellule fixée à l'alcool méthylique perd en 30 secondes une grande partie de sa colorabilité nucléaire et la totalité de sa colorabilité cytoplasmique dans la solution physiologique chaude. Elle conserve, au contraire, intégralement l'une et l'autre après une minute dans les mêmes conditions si elle a été préalablement fixée dans le formol salé neutralisé.

Les préparations sont alors plongées pendant 5 minutes dans une solution normale d'acide chlorhydrique à 60° C (8,35 ml. de ClH fumant pour 100 ml. d'eau bidistillée). Elles sont alors lavées à l'eau du robinet (alcaline à Paris) puis séchées avant d'être colorées au Wright.

Le témoin « eau distillée » classique est totalement inutile car c'est un faux-témoin : les altérations cellulaires sont, en effet, constamment plus marquées (et de beaucoup) après le traitement à l'eau distillée qu'après le traitement dans la solution chlorhydrique : après fixation méthylrique, en particulier, les lames, plongées dans l'eau distillée chaude, montrent une très importante diminution de la colorabilité nucléaire, si admirablement conservée après le traitement dans la solution chlorhydrique.

RÉSULTATS

Les noyaux des cellules et les équivalents nucléaires des bactéries (Colibacilles) conservent une teinte violette mais celle-ci acquiert une intensité tout à fait caractéristique et qui rend les frottis ainsi traités immédiatement reconnaissables. La basophilie cytoplasmique a, au contraire, dans les deux cas entièrement disparu.

DEUXIEME PARTIE

**LES DONNÉES MORPHOLOGIQUES
IMMÉDIATES**

A) DEFINITION ET DESCRIPTION DES PARTICULES ELEMENTAIRES

La morphologie et les affinités tinctoriales des virus du groupe de la psittacose sont beaucoup plus variables que les données classiques ne le laissent entendre.

L'ordre que nous suivrons ici sera purement descriptif et basé uniquement sur les différences d'aspect des particules de virus : il ne préjuge donc en rien de la filiation ou de la signification des éléments.

1° CORPS ÉLÉMENTAIRES. On désigne ordinairement sous ce vocable des particules régulièrement arrondies, sphériques, uniformément teintées par les colorants basiques (fuchsine diluée ou bleu de méthylène) mais surtout admirablement mises en évidence par le colorant de Wright, auquel nous nous en tiendrons dans cet exposé, et qui ne permet de constater aucune structure interne apparente. Les deux procédés courants d'utilisation (procédé A ou procédé R) aussi bien que les procédés cytochimiques conduisent toujours à la même morphologie : les corps élémentaires ne sont, en effet, pas atteints par la Ribonucléase et résistent à l'hydrolyse chlorhydrique ménagée du Piékariski-Robinow; *ils se comportent donc comme de véritables granules désoxyribonucléiques.*

Il existe trois types principaux de corps élémentaires qui peuvent être classés selon leurs dimensions et selon leur teinte.

a) *Les corps élémentaires les plus fins*, fréquents dans les cultures obtenues par inoculation dans le sac allantoïque avec les souches de psittacose, sont à la limite de la visibilité et se colorent faiblement en violet-bleu. Leurs dimensions sont inférieures à 250 m μ .

b) *Les corps élémentaires les plus typiques*, obtenus surtout dans le poumon de la souris et dans la membrane vitelline de l'œuf, ont des dimensions un peu plus grandes, leur diamètre étant voisin de 350 m μ , et une coloration violet-rougeâtre, beaucoup plus marquée que celles des éléments précédents.

c) *Les corps élémentaires les plus volumineux* s'observent avec certaines souches à l'intérieur des cellules épithéliales de la chorio-allantoïde (souche Larufa, par exemple, sur cette membrane).

Ils ont une teinte violette extrêmement intense et homogène, légèrement rougeâtre, et un diamètre voisin de 500 à 600 m μ .

Ce sont eux qui ont été décrits par Bedson et Bland, à l'origine, pour le virus de la psittacose sous le nom de « corps initiaux » par allusion à leur stade chronologique supposé dans le « cycle obligatoire » également décrit par ces auteurs.

Afin de nous en tenir, pour l'instant, à la position strictement morphologique de ce paragraphe, nous les désignerons simplement sous le nom de « corps intermédiaires » ou de « corps élémentaires géants » pour bien marquer leur volume et leurs dimensions situées à mi-chemin entre celles des corps polymorphes et celles des autres types de corps élémentaires.

2° CORPS POLYMORPHES. Nous leur avons réservé ce nom en raison de leur morphologie et de leur taille.

Ils s'opposent également aux corps élémentaires par une plus grande complexité de leur structure interne, constamment visible sur préparations colorées par la solution extemporanée de Wright, après fixation alcoolique (procédé A) : on y distingue en effet, toujours la membrane cytoplasmique périphérique, colorée en violet bleu et un ou plusieurs granules chromatiques de teinte caractéristique violet-rougeâtre et constamment disposés à la partie interne de la membrane cytoplasmique.

Nombre de ces éléments ont été aperçus d'emblée par Lindner qui les a décrit sous le nom de « corps initiaux » dans le Trachome humain. Ils ont aussi été signalés par Levinthal avec le virus de la psittacose en 1933 sous le vocable de « formes d'involution » terminologie qui est, sans doute, pour beaucoup dans l'oubli où ils sont tombés depuis cette date malgré leur fréquence et leur énorme intérêt théorique.

Il existe aussi trois catégories principales de corps polymorphes.

a) *Les corps unipolaires* dont le diamètre est compris entre 450 et 600 m μ et qui ont par conséquent, des dimensions un peu plus variables que celles des corps élémentaires géants mais, dans l'ensemble, assez voisines.

Ils sont fréquents dans le liquide allantoïque de l'œuf, avec les souches de psittacose.

Après fixation alcoolique et coloration au Wright, le granule chromatique interne se montre aussi de dimensions assez variables et s'il est susceptible d'occuper, parfois, la plus grande partie de l'élément, il peut, au contraire, aussi être à peine visible. Avec le procédé A également, la masse protoplasmique centrale de l'anneau reste claire presque incolore, avec une légère teinte bleutée.

Avec le procédé R, sans fixation alcoolique et avec mordantage préalable au bleu de méthylène, la masse protoplasmique centrale se colore seule, au contraire, et les éléments apparaissent comme de volumineux corps élémentaires indifférenciés un peu moins colorables cependant que les corps élémentaires géants avec cette technique.

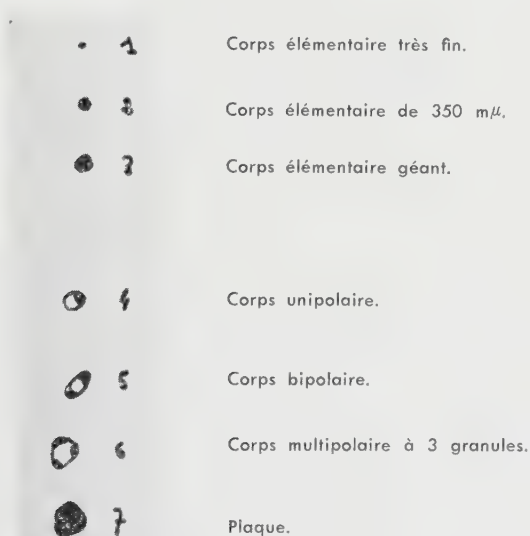


Fig. 4. — Les différents types de particules virulentes du groupe T. P. L.

b) *Les corps bipolaires* sont munis de deux granules chromatiques polaires; ils ont une forme allongée et peuvent atteindre 1 ou 1,5 μ de long sur 0,5 à 0,8 μ de large.

Leur morphologie, invariable quel que soit le traitement préalable utilisé avant le colorant de Wright (procédé A ou procédé R), est caractérisé *par un espace clair central*, régulièrement incolore — ce que nous interprétons comme une raréfaction de la masse protoplasmique à ce niveau (donnée confirmée d'ailleurs par la morphologie bipolaire en Encre de Chine qui témoigne bien d'un aplatissement central de l'élément).

Les granules chromatiques adhèrent à la partie interne de la membrane cytoplasmique et font, ici, véritablement corps avec elle, la morphologie rappelant assez celle des Rickettsies du groupe oriental ou des Rickettsies des typhus cultivées dans le

poumon des rongeurs : c'est pourquoi nous les désignerons souvent sous le nom de « corps rickettsioïdes ».

Les dimensions des granules chromatiques sont souvent très grandes avec ces éléments où ils peuvent atteindre 250 et 300 m μ .

Les corps rickettsioïdes sont surtout présents dans certains frottis de membrane chorio-allantoïde lors des cultures effectuées sur cette membrane.

c) *Corps multipolaires et plaques*. Ce sont les plus grands des corps polymorphes et, aussi, ceux qui présentent les plus grandes variations morphologiques. Leur diamètre peut, en effet, varier de 0,6 μ à 1,5 μ et atteint même, parfois, 3 μ et davantage. Leur forme est irrégulière, comme le sont aussi leur teinte et leur structure.

Certains éléments, ordinairement les moins volumineux, ont une masse protoplasmique centrale claire après fixation alcoolique et difficilement colorable, même après mordantage au bleu méthylène : ils se rapprochent des corps rickettsioïdes par la présence évidente de granules périphériques et ne s'en distinguent que par le nombre de ces granules qui est, ordinairement, de trois ou quatre.

D'autres éléments, au contraire, de dimensions souvent énormes, ont une structure plus homogène avec un renforcement périphérique assez net de la colorabilité. L'ensemble de l'élément prend, en effet, une teinte moyennement violette au Wright (même après fixation alcoolique) mais sans que la colorabilité atteigne jamais celle des corps élémentaires de plus grande taille. Ces formes géantes, fréquentes dans le sac vitellin avec certaines souches paraissent correspondre aux « *plaques* » des auteurs classiques dont nous leur conserverons le nom pour les différencier des véritables « *corps multipolaires* » dont les granules chromatiques sont nettement visibles.

Ces plaques doivent être bien distinguées des « *gangues* » dont les dimensions sont parfois analogues et avec lesquelles elles semblent si souvent avoir été confondues (voir ci-après).

Avec les *procédés cytochimiques*, les corps polymorphes ont un comportement tout à fait caractéristique : leur granule chromatique résistant seul à l'action de la Ribonucléase ou de l'acide chlorhydrique. Les granules chromatiques paraissent donc assez analogues aux corps élémentaires et semblent renfermer une quantité appréciable d'acide désoxyribonucléique; le reste du protoplasme des corps polymorphes qui devient incolore après action de la ribonucléase et ne résiste pas à l'action dissolvante de l'acide chlorhydrique, paraît, au contraire, renfermer une certaine quantité d'acide ribonucléique.

Les corps polymorphes sont donc plus complexes que les corps élémentaires — leur structure n'étant pas sans rappeler celle des bactéries avec un cytoplasme et des granules de chromatine qui ressemblent assez à des équivalents nucléaires.

B) GROUPEMENT DES PARTICULES ELEMENTAIRES

La multiplication des virus du groupe de la psittacose à l'intérieur des cellules parasitées aboutit finalement à la rupture de la cellule, d'où résulte la libération des particules virulentes qui deviennent ainsi capables d'infecter de nouvelles cellules et de commencer de nouveaux cycles.

Les frottis montrent cependant constamment une quantité de particules virulentes extra-cellulaires bien supérieure à celles des éléments spontanément libérés (ce dont il est facile de se rendre compte selon la vigueur employée lors du frottis) : nombre de cellules se trouvent mécaniquement dilacérées soit en raison de leur fragilité propre (cellules de la membrane vitelline, cellules alvéolaires de la souris), soit à la suite d'une diminution de leur résistance provoquée par l'envahissement de leur cytoplasme par la culture.

Nous ne nous préoccupons pas, pour l'instant, au stade purement descriptif où nous sommes, de distinguer les particules spontanément libérées et celles qui l'ont été artificiellement pour des raisons d'ordre mécanique.

Les formes libres peuvent, elles-mêmes, être isolées ou groupées en amas caractéristiques auxquelles nous réserverons les noms de « colonie » ou de « globi », seules formations que l'on rencontre aussi à l'intérieur des cellules intactes.

1° FORMES ISOLÉES DES FROTTIS. Elles peuvent correspondre soit aux corps élémentaires, soit aux corps polymorphes.

Les formes élémentaires libres affectent d'ailleurs un groupement par paires tellement fréquent que nous avons cru utile de l'individualiser sous le nom de « diplocorps ».

On constate aussi parfois, mais beaucoup plus rarement, la formation de véritables chainettes.

Avec les corps polymorphes, le groupement par paires existe aussi mais il est encore beaucoup plus exceptionnel.

2° COLONIES. Ce sont des formations souvent très volumineuses et qui atteignent ou dépassent 7 et 8 μ .

On peut y rencontrer les deux grandes catégories morphologiques et il y a des colonies de corps élémentaires et des colonies de corps polymorphes.

Les deux types d'éléments sont, aussi, très fréquemment associés à l'intérieur d'une même colonie, les proportions demeurant alors extrêmement variables d'une colonie à l'autre.

Les colonies peuvent être *uniques* ou *multiples* à l'intérieur du cytoplasme des cellules parasitées (selon que l'infection cellulaire initiale a été unifocale ou plurifocale) et le cytoplasme peut même, parfois, être envahi dans son entier : on obtient ainsi ce que nous appelons les « *cellules de Mooser* » de la psittacose parce qu'elles rappellent de très près les cellules de Mooser du typhus murin où la disposition des rickettsies est absolument identique.

Avec la souche « Compiègne 56 » d'avortement de la brebis, par exemple, on obtient régulièrement de telles cellules lors des cultures sur les épithéliums choriaux : celui de l'œuf de poule ou celui de l'œuf de brebis.

Selon leur constitution, on peut distinguer trois types de colonies virales :

a) *Les colonies vacuolaires* où les éléments virulents, ordinairement des corps élémentaires, sont séparés les uns des autres et baignent dans un liquide incolore.

L'examen à l'état frais les montre alors agités d'un mouvement brownien ce qui démontre bien leur présence à l'intérieur d'une vacuole néoformée.

b) *Colonies matricielles*. Dans ces colonies, les particules virales sont agglomérées entre elles par un véritable ciment, qui n'est pas colorable au Wright mais dont l'existence est péremptoirement démontrée par la *cohésion* conférée aux particules. Si, en effet, on détruit mécaniquement les cytoplasmes (au cours d'un frottis brutal par exemple ou par broyage), on ne détruit pas, pour autant, la colonie qui se retrouve intacte mais à l'état libre.

Ce ciment incolore paraît correspondre à « la matrice » décrite par Halberstaedter pour le virus du Trachome et c'est pourquoi nous avons choisi le nom de « colonies matricielles ».

c) *Colonies à gangue*. Ce dernier type est entouré d'une sorte d'enveloppe *colorable* ou « gangue ».

Au Wright, après fixation alcoolique, les gangues sont beiges, bleutées ou polychromatophiles, exactement comme peuvent l'être des hématies. Elles paraissent correspondre à « la substance analogue à de la plastine » de Prowazek et Halberstaedter, décrite encore à propos du Trachome.

Il convient de noter que les gangues, si elles sont associées aux virus du groupe T. P. L. ne sont pas obligatoirement habitées par des particules de virus : elles peuvent aussi se rencontrer seules à l'intérieur des cytoplasmes ou à l'état libre sur les frottis.



Diplocorps.



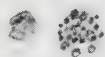
Colonie vacuolaire.



Colonie matricielle intracellulaire.



Colonie matricielle libérée.



Colonie à gangue intra-cellulaire (1 gangue inhabitée)



Colonie à gangue libre.



Gangue libre.

Fig. 5

Elles possèdent, par elles-mêmes, une indiscutable cohésion et résistent aussi dans les circonstances traumatisantes susceptibles de faire disparaître les cytoplasmes.

On ne doit pas les confondre avec les plaques dont elles n'ont ni la teinte ni la structure. Il ne faut pas les prendre non plus pour de véritables débris cellulaires phagocytés (comme ceux que l'on trouve par exemple dans la rate) ni pour les « inclusions violettes » des polynucléaires si fréquentes dans les cultures à la fois assez intenses et assez durables (les polynucléaires apparaissent en effet, avec les virus du groupe T. P. L. régulièrement dans ce cas et contiennent très fréquemment des inclusions cytoplasmiques violettes au Wright, extrêmement irrégulières dans leur taille et leur morphologie, et qui paraissent traduire une véritable phagocytose du virus).

La nature virulente des gangues, qu'elles soient « habitées » par des particules du virus ou « inhabitées » reste encore à démontrer : ce sera précisément le premier problème dont nous allons avoir à nous occuper.

TROISIEME PARTIE

PROBLÈMES D'INTERPRÉTATION

A) DETERMINISME DE LA FORMATION DES GANGUES

Nous avons vu que les gangues sont fréquemment associées aux virus du groupe T. P. L. mais nous ne savons pas encore s'il s'agit de formations spécifiquement liées au virus ou de simples différenciations « réactionnelles » des cellules infectées.

Certes, les gangues ne possèdent pas les caractères de colorabilité des particules de virus ni leur teinte violette habituelle avec les éosinates mais cette constatation, de nature à jeter un doute sur leur spécificité, ne leur confère pas, pour autant, le caractère définitif de lésions cellulaires évidentes.

1° *Supposons un instant que les gangues soient réellement des formations spécifiques* et voyons si les faits cadrent avec cette hypothèse.

Les gangues devraient, dans ces conditions, être constamment associées aux cultures des virus du groupe T. P. L. et faire, au contraire, défaut avec les autres catégories de microorganismes.

a) *Multiplication des virus du groupe de la psittacose sans formation de gangues.*

Avec les virus du groupe de la psittacose, nous n'avons jamais observé de gangues lors des cultures *massives* dans le poumon de la souris.

Nous n'en avons jamais vu, non plus, avec aucune de nos souches pendant leur multiplication dans les tissus épithéliaux (épithélium chorial avec la souche Larufa ou les souches d'avortement de la brebis par exemple).

L'apparition des gangues est donc un phénomène contingent et facultatif et ne revêt aucun caractère obligatoire.

b) *Formation des gangues avec d'autres catégories de germes.*

Nous avons pu obtenir des gangues tout à fait typiques avec des souches de Rickettsies ou avec des souches de péripleumonie de la souris.

— *Avec les Rickettsies.* C'est le groupe oriental qui nous a conduit à la plus forte proportion de gangues et nous les avons rencontrées dans le péritoine de la souris avec les dix souches indochinoises de *R. tsutsugamuchi* que nous avons eu l'occasion d'étudier.

— *Péripnémonies*. Au cours de passages en série par voie nasale chez la souris, nous avons fréquemment isolé le micro-organisme du groupe de la péripnémonie décrit par Herzberg en 1940 (10) comme responsable d'une pneumopathie de l'animal.

Nous avons étudié longuement ce germe dans les cultures pulmonaires et nous avons pu observer avec lui des gangues tout à fait typiques. Dès que la quantité de virus est trop faible pour provoquer une évolution suraiguë de l'infection, on peut, en effet, obtenir régulièrement une pneumonie chronique à cellules mononucléées où les gangues sont toujours extrêmement nombreuses.

Les gangues ne sont donc pas forcément spécifique des virus du groupe T. P. L.

Leur caractère de lésion cellulaire semble, par conséquent, s'imposer.

Ces constatations nous obligent à examiner de plus près la cytologie des frottis et les circonstances d'apparition des gangues.

2° Formation, évolution et signification des gangues

a) *Les gangues apparaissent toujours en même temps que les monocytes.*

Si les cultures de Rickettsies, du microorganisme de Herzberg ou des virus du groupe T. P. L. ne permettent par l'apparition des monocytes, on ne rencontre jamais de gangues.

Le fait est évident dans le poumon de la souris où les cultures massives, qui s'effectuent sans monocytes, ne permettent jamais d'observer de gangues.

Les cultures pulmonaires lentes entraînent, au contraire, un afflux considérable de monocytes et le cytoplasme de ces cellules est alors très fréquemment envahi par une ou plusieurs gangues caractéristiques. Nombre de monocytes sont également rompus, soit mécaniquement soit spontanément, et il existe toujours un grand nombre de gangues isolées tout à fait typiques.

Si on étudie d'autres organes, ceux où l'on rencontre des gangues sont également ceux où il est possible de voir apparaître un exsudat à monocytes (tissu sous-cutané de la souris pour les souches de péripnémonie; péritoine du même animal pour *R. tsutsugamuchi*).

Les gangues paraissent donc liées davantage au type de cellule parasité qu'au genre de souche capable de s'y multiplier

b) *Evolution des gangues à l'intérieur des monocytes.*

Nous avons suivi cette évolution au cours du temps non seulement avec les virus du groupe T. P. L. mais encore avec le micro-

organisme de Herzberg et avec les souches diverses de *R. tsutsugamuchi*.

Nous avons vu ainsi se modifier peu à peu la proportion des différents types de gangues et nous avons pu nous rendre compte de leur ordre réel d'apparition.

A leur stade initial, les gangues, peu nombreuses, sont encore très *basophiles* et sont colorées en bleu avec le colorant de Wright (procédé A). Ultérieurement, on voit augmenter la proportion des gangues *acidophiles* qui se teintent en beige (comme les hématies) avec le colorant de Wright, les gangues beiges coexistent toujours au Wright avec des gangues *polychromatophiles* de transition.

c) *Relation entre l'évolution des gangues et les stades de la dégénérescence éosinophile des monocytes.*

Parallèlement à l'apparition massive des gangues, on observe toujours l'accroissement régulier du nombre des monocytes en « *dégénérescence éosinophile* ».

Les caractères de colorabilité du cytoplasme des cellules en dégénérescence évoluent exactement comme ceux des gangues en passant successivement par un stade initial basophile puis par un stade terminal acidophile.

A ce moment, au Wright, le noyau seul, pycnotique, hypercolorable et rétracté, est encore bleu, dans un cytoplasme beige. On va alors voir apparaître au centre du noyau une masse amorphe, également beige, qui va s'étendre et réduire peu à peu la partie colorée en bleu à l'état d'un mince liseré nucléaire périphérique. Finalement, le noyau entier va prendre une teinte beige et la cellule va se trouver réduite à un globule arrondi et uniforme.

La dégénérescence éosinophile des monocytes paraît bien être un phénomène identique dans son mécanisme à celui de la formation des gangues : dans les deux cas, on observe, en effet, une évolution analogue de formations qui coexistent régulièrement sur les frottis et se rencontrent toujours à l'intérieur d'un type de cellule rigoureusement homogène.

C'est pourquoi nous considérons les gangues comme des foyers localisés de nécrose des monocytes, cette nécrose, elle-même passant par deux stades successifs : un stade *prénécrotique* basophile et un stade *adulte*, franchement nécrotique, acidophile.

Nous avons noté déjà la cohésion remarquable des gangues tout à fait analogue d'ailleurs à celles des monocytes totalement dégénérés que l'on retrouve également intacts sur les frottis après rupture mécanique des cytoplasmes normaux : c'est pourquoi, nous interprétons dans les deux cas l'image observée comme une véritable *nécrose cellulaire* (localisée ou diffuse) par *coagulation*.

Selon le Dr Pierre Lépine (14), les gangues intra-cellulaires existent aussi avec le virus rabique : elles peuvent être associées ou non aux corps de Négri dont elles se distinguent cependant par leur affinité pour les colorants : elles correspondent aussi, dans ce cas à une nécrose cellulaire par coagulation qui frappe, cette fois, d'autres cellules que les monocytes. (communication personnelle).

d) *Relations entre les gangues et les particules de virus.*

Il existe, on s'en souvient, deux types de gangues : les gangues « habitées » par des éléments virulents et les gangues « inhabitées ».

On retrouve le même phénomène avec les monocytes en dégénérescence acidophile : certains renferment des colonies, d'autres sont absolument « stériles ».

Les « gangues habitées » peuvent évidemment être considérées comme une véritable nécrose cellulaire périvirale mais il reste à expliquer la formation des « gangues stériles » et des monocytes dégénérés dont le cytoplasme est dépourvu de virus.

Il nous semble que ces deux types de phénomènes réactionnels peuvent s'interpréter comme de véritables *foyers* avortés d'infection cellulaire, la pénétration des particules de virus n'ayant pas été suivie d'une prolifération décelable, soit par suite de la précocité de la nécrose, soit encore en raison du caractère insuffisamment virulent des particules de virus fixées par la cellule : on sait, en effet, que le nombre des particules réellement infectantes est toujours très inférieur avec les virus du groupe T. P. L. à celui des éléments originellement inoculés.

e) *Relation entre les gangues et les divers types de colonies.*

Ce que nous savons désormais des gangues et de leur nature simplifie beaucoup l'analyse du déterminisme des différentes sortes de colonies.

Les « colonies à gangues » apparaissent, en effet, comme des cultures associées à une nécrose cellulaire périvirale.

Les « colonies matricielles » qui sont la règle en dehors des monocytes ne s'accompagnent, au contraire, d'aucune nécrose réactionnelle : elles correspondent à une agglomération de particules virales à l'état pur, la substance incolore inter-particulaire paraissant correspondre simplement à la membrane propre des virus du groupe T. P. L.

En CONCLUSION : Les gangues, formations cellulaires réactionnelles, ne font pas partie de l'évolution propre des virus du groupe T. P. L. Elles sont, par conséquent, étrangères au sujet qui nous intéresse et ne seront plus évoqués dans la suite de ce travail.

B) DETERMINISME DES DIFFERENTS TYPES MORPHOLOGIQUES

Insister sur le polymorphisme d'un germe est bien peu de chose : il est évidemment beaucoup plus important de préciser la *filiation* des éléments observés et le *déterminisme particulier* de chaque type morphologique.

On s'est efforcé de le faire dès le début des études sur les virus du groupe T. P. L. et il en est résulté, on s'en souvient, deux théories principales (voir historique) fort inégalement appréciées aujourd'hui.

La *théorie classique* du « cycle évolutif obligatoire » selon laquelle, le virus obéirait, au cours de son développement, à un déterminisme interne capable de lui faire parcourir un véritable cycle (21) (Planche I, page 100).

La « *théorie des variations morphologiques adaptives* » (16) d'après laquelle la morphologie du virus serait, au contraire, entièrement conditionnée par la constitution du milieu cellulaire de culture, le cycle réel du virus étant la traduction simple d'une modification cellulaire continue, consécutive à l'altération progressive des cellules infestées (Planche II, page 101).

Ces deux théories, si différentes du point de vue de la *causalité* des phénomènes, font cependant état, l'une et l'autre, des mêmes variations cycliques des gros virus et admettent le postulat du rôle primordial des corps élémentaires (voir Planches I et II, pages 100 et 101).

Pour les classiques, le cycle intracellulaire obligatoire va, en effet, du corps élémentaire infectant aux corps élémentaires finalement libérés par la rupture des cellules parasitées.

Pour Levinthal (2^e théorie), la diminution progressive de la résistance cellulaire conduit seule à la formation terminale des corps élémentaires, les autres figures présentes à ce stade (et qui correspondent à nos corps polymorphes) étant des « formes d'involution » ou « de dégénérescence », totalement dépourvues d'intérêt.

Le corps élémentaire est donc bien envisagé dans les deux cas comme la *seule particule* libérée spontanément par les cellules, ce qui lui conférerait, dans la pratique, le rôle exclusif d'*initiateur* de l'infection.

Ces théories, souvent fort séduisantes, nous semblent pourtant assez peu étayées du point de vue expérimental. C'est pourquoi nous avons essayé de répondre, autant que possible, par des expériences aux quatre questions fondamentales qui nous semblent posées plus que résolues.

1° *Le corps élémentaire est-il la seule particule virale spontanément libérée?*

2° *Le corps élémentaire est-il le seul initiateur possible de l'infection cellulaire?*

3° *Y-a-t-il ou non une évolution cyclique des gros virus?*

4° *Quel est le facteur déterminant de leur morphologie? Un facteur purement génétique ou un facteur externe à rechercher dans le milieu cellulaire de culture?*

I. - NATURE DES PARTICULES DE VIRUS SPONTANÉMENT LIBÉRÉES PAR LES CELLULES.

Pour identifier ces particules sans aucun risque d'erreur, il est évidemment essentiel d'empêcher leur libération « traumatique » lors des frottis de cellules parasitées.

Nous avons dû choisir, par conséquent, des techniques assez délicates pour éliminer en toute certitude cette importante cause d'erreur : pour cela, nous nous sommes adressée à des souches de virulence élevée, comme les souches de psittacose « Weaver Ageon » et « Bordeaux 56 » qui cultivent remarquablement dans les cellules de l'épithélium allantoïque et nous avons effectué la ponction pure et simple du liquide entre le 6° et le 8° pour de la culture.

On trouve alors toujours sur les frottis quelques cellules desquamées, relativement peu nombreuses, des corps élémentaires en abondance et, surtout, une énorme variété de corps polymorphes (parmi lesques prédominent ordinairement les aspects unipolaires). Il existe aussi, toujours, à l'état libre, des colonies de types divers.

Le corps élémentaire n'est donc pas la seule particule virale spontanément libérée par les cellules.

Ce résultat nous obligeait donc, plus que jamais, à nous demander si les autres types morphologiques ainsi libérés ne pouvaient également assumer le rôle d'*initiateurs* de l'infection, rôle jusqu'ici dévolu au seul corps élémentaire — mais il nous fallait, pour cela, disposer au préalable de particules de virus en lots homogènes.

II. — ESSAI D'OBTENTION DE PARTICULES HOMOGÈNES

Nous aurions pu songer à utiliser un matériel mixte (comme celui des liquides allantoïques) mais il nous aurait fallu auparavant apprendre à « trier » les particules de virus de façon à les

séparer selon les types morphologiques. Cette entreprise ne nous a pas semblé des plus aisée et nous avons préféré nous engager dans une voie quelque peu différente où les chances de succès nous paraissaient moins hasardeuses.

Nous avons, en effet, remarqué au cours des passages une prédominance parfois très marquée de l'un ou l'autre des types morphologiques de sorte que nous avons été conduite à envisager la possibilité d'obtenir, peut-être directement, chaque type d'élément en culture pure.

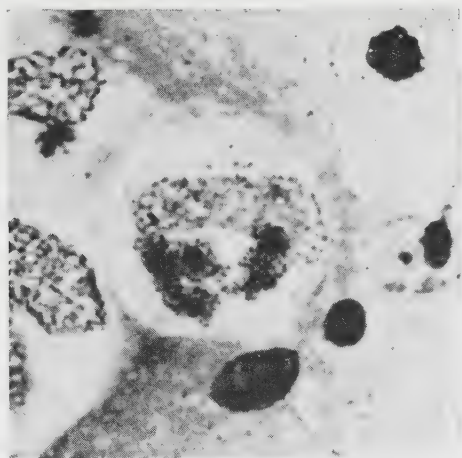


Fig. 6. — Souche Larufa dans les cellules de l'épithélium chorial de l'œuf de poule. Colonies intra-cytoplasmiques de corps élémentaires géants. Coloration Wright A.

Gr. : x 1.220.

(Photo. P. Manigault, Institut Pasteur.)

Il ne nous restait plus qu'à trouver les conditions exactes qui devaient nous permettre d'y parvenir et ce ne fut pas la partie la moins fastidieuse ni la moins considérable de ce travail.

Afin d'accroître, au maximum, les chances de réussite, nous avons, en effet, dû « passer » *le plus grand nombre possible de souches dans le plus grand nombre possible de tissus sensibles*. Nous avons aussi, pour chaque passage, utilisé une population sensible assez importante pour soustraire à l'influence du hasard les résultats obtenus (30 à 100 animaux ou œufs par essai, chaque essai, lui-même, ayant été répété plusieurs fois).

Nous avons contrôlé sur frottis colorés au Wright les résultats individuels de chaque inoculation. Enfin, dans tous les cas

où nous avons cru constater, au premier abord, une culture pure d'un type unique, nous avons repris entièrement les expériences en sacrifiant les animaux ou les œufs après un temps variable, de façon à éliminer les variations morphologiques transitoires en cours de culture.



Fig. 7. — Virus d'avortement de la brebis après culture dans les cellules de l'épithélium chorial de l'œuf de poule. Corps rickettsioides bipolaires tout à fait semblables à *R. orientalis*. Coloration Wright A ».

Gr. : x 1.220.

(Photo. P. Manigault, Institut Pasteur.)

C'est ainsi qu'après un long travail, pour lequel nous avons utilisé plusieurs milliers d'animaux et d'œufs, nous avons été capable d'obtenir « *en culture pure* » trois types morphologiques distincts de particules virulentes : les corps élémentaires de 350 m μ , les corps élémentaires géants de 500 m μ et les corps rickettsioides (34).

a) *Corps élémentaires de 350 m μ .*

Ce sont eux qui nous ont apporté les premiers succès.

Les souches « Larufa » et « Mooser » nous ont, en effet, permis d'obtenir assez rapidement les corps élémentaires en culture pure dans les cellules alvéolaires du poumon de la souris.

b) *Corps élémentaires géants.*

Ce sont encore les souches « Larufa » et « Mooser » qui nous ont conduit ici à des résultats positifs.

C'est, en effet, avec des suspensions de corps élémentaires provenant du poumon de la souris que nous avons pu obtenir dans l'œuf avec ces deux souches des éléments de 500 à 600 $m\mu$, tout à fait analogues aux corps initiaux de Bedson et Bland, et constituant à eux seuls l'ensemble des particules visibles.

Avec la souche Mooser, nous avons observé le phénomène dans le cytoplasme des cellules de l'épithélium *allantoïque* alors que nous l'avons noté, avec la souche « Larufa », dans les cellules de l'épithélium *chorial*.

c) *Corps rickettsioïdes.*

Nous les avons obtenus en culture pure par inoculation des trois souches d'avortement de la brebis sur épithélium chorial de l'œuf.

Encore, n'avons-nous jamais pu réaliser cette culture pure sur plus de 25 % en moyenne des œufs inoculés : 25 % environ des œufs infectés ne permettaient pas, en effet, d'atteindre un niveau suffisant de culture, les 50 % restants conduisant à une association avec des corps élémentaires.

Dans les conditions précises de nos expériences, nous avons donc pu séparer en culture pure trois grands types morphologiques des virus du groupe T. P. L. : les corps élémentaires de 350 $m\mu$, les corps élémentaires géants et les corps rickettsioïdes.

III. — CAPACITÉS INFECTANTES DES TROIS TYPES MORPHOLOGIQUES OBTENUS EN CULTURE PURE

a) *Corps élémentaires.*

Il est presque inutile d'insister sur le rôle infectant des corps élémentaires car personne ne songe à le contester. Nous nous contenterons donc seulement de rappeler qu'une grande partie de nos expériences a été réalisée avec des virus cultivés dans le poumon de la souris, c'est-à-dire dans des conditions où nous avons obtenu presque exclusivement des corps élémentaires.

b) *Corps élémentaires géants et corps rickettsioïdes.*

Nous avons effectué des passages en retour à partir d'organes riches en formes exclusives de l'un ou l'autre des deux types.

Pour les corps élémentaires géants, nous avons donc utilisé des broyats de membranes chorales infectées avec la souche « Mooser ».

Pour les corps rickettsioïdes, nous avons employé des suspensions provenant également de membranes chorales, mais après inoculation et culture des souches d'avortement de la brebis.

C'est principalement dans le poumon de la souris que nous avons effectué les subcultures. Nous avons eu cependant recours aussi au sac vitellin de l'œuf si la toxicité propre des souches étudiées nous le permettait (pour des souches toxiques comme la souche Larufa, nous ne nous sommes donc servie que du poumon de la souris).

Tous les animaux ou les œufs infectés, au nombre de plusieurs dizaines par essai, sont morts à la suite des inoculations. A l'autopsie des souris, on trouvait une pneumopathie tout à fait caractéristique avec hépatisation pulmonaire massive. Les embryons des œufs étaient eux-mêmes intensément congestifs. Il y avait toujours une quantité considérable de virus sur les frottis de membrane vitelline ou de poumon de souris.

Après chaque subculture, nous avons vérifié systématiquement l'identité des souches récupérées en les étudiant dans les conditions précédemment définies (voir première partie) du point de vue de leur toxicité et de leur virulence. Dans tous les cas, les souches de subculture correspondaient exactement aux souches primitivement inoculées.

Ces constatations rigoureuses démontrent donc le pouvoir infectant des corps élémentaires géants et des corps rickettsioïdes et confirment celui des corps élémentaires.

Pour les corps rickettsioïdes, rarement signalés dans la littérature et simplement mentionnés par Levinthal par exemple parmi les « formes d'involution », nous apportons ainsi, *pour la première fois*, la preuve d'une vitalité indéniable que seul, Lindner, pour la Trachome, en 1910, avait entrevue.

IV. — CAPACITÉS INFECTANTES DES FORMES INTRA-CELLULAIRES EXCLUSIVES

La démonstration de la capacité infectante des formes intracellulaires exclusives résulte, dans nos études, du pouvoir infectant des corps élémentaires géants obtenus en culture pure car

nous avons pu apporter la preuve du caractère strictement intra-cellulaire de ces formations.

Dans les deux circonstances où nous avons obtenu les corps élémentaires géants en culture pure (souche Larufa sur épithélium chorial, souche Mooser sur épithélium allantoïque) nous avons, en effet, été frappée par le très petit nombre des particules libres sur les frottis; nous avons pourtant effectué ces frottis avec une certaine brutalité destinée à la fragmentation des épithéliums.

Nous avons donc procédé à un examen soigné des liquides correspondants pour y rechercher les particules spontanément libérées.

Nous ne reviendrons pas sur la technique de prélèvement du liquide allantoïque sur laquelle nous avons déjà insisté précédemment et qui nous a servi aussi dans cette recherche.

Pour l'épithélium chorial, nous avons obtenu le liquide nécessaire en prélevant par capillarité, à la pipette Pasteur l'eau de condensation qui s'y trouvait spontanément ou en effectuant un lavage délicat avec quelques gouttes d'eau physiologique.

Dans les deux cas, nous n'avons décelé aucune particule de virus dans les liquides, ni à l'examen microscopique, ni par passage.

Nous avons en effet, centrifugé les deux liquides (1) à 10.000 g. pendant 30 minutes de façon à sédimenter d'éventuelles particules de virus et nous avons effectué des subcultures du culot de centrifugation, toujours discret, dans le poumon de la souris ou la membrane vitelline de l'œuf sans jamais pouvoir récupérer les souches qu'il était, au contraire, si facile d'obtenir à partir des membranes elles-mêmes.

La culture des souches Larufa et Mooser est donc strictement intra-cellulaire dans les deux cas où elles nous ont permis d'obtenir des corps élémentaires géants en culture pure.

Ainsi se trouve démontré le pouvoir infectant des formes strictement intra-cellulaires des virus du groupe T. P. L.

Dès 1934 déjà, Bedson et Bland (2) avaient entrevu le pouvoir infectant des « corps initiaux » de la psittacose et ils en avaient entrepris la démonstration.

Ils avaient utilisé pour cela un *artifice chronologique* en observant des frottis de rate de souris effectués à temps variable après inoculation péritonéale; ils avaient, en effet, remarqué l'antériorité d'apparition des « corps initiaux » (ou corps élé-

(1) Pour les eaux de condensation ou de lavage de l'épithélium chorial, nous avons mélangé les liquides obtenus pour l'ensemble des œufs d'un même essai et c'est avec ce liquide global que nous avons procédé aux centrifugations.

mentaires géants) par rapport aux corps élémentaires de dimensions inférieures à $350 \text{ m}\mu$ et ils avaient mis à profit cette particularité en effectuant des passages à partir de rates prélevées aux stades initiaux de culture.

Pourtant, il était impossible d'exclure en toute certitude dans ces expériences le rôle possible des corps élémentaires, toujours présents en réalité dans le matériel infectant utilisé, ainsi que nous avons pu nous en rendre compte en répétant ces expériences — ce qui enlevait une grande partie de leur valeur aux résultats de Bedson et Bland.

C'est pourquoi nous avons pris grand soin d'écarter cette cause d'erreur dans les expériences que nous avons faites.

V. — SUBCULTURE INDÉFINIE DES TYPES MORPHOLOGIQUES HOMOGÈNES

S'il est possible d'obtenir trois types morphologiques essentiels en culture pure, il ne s'ensuit pas nécessairement qu'on puisse réaliser la transmission expérimentale indéfinie sans aucune variation transitoire de morphologie et sans aucun cycle.

Des passages indéfinis sous forme de corps élémentaires seulement ou de corps initiaux, voire de corps rickettsioïdes s'accorderaient même fort mal de la théorie classique du cycle obligatoire : *dans cette hypothèse, en effet, en obligeant un virus à se maintenir sous un aspect morphologique invariable, on devrait aboutir à un blocage du cycle et, par contre-coup, à un arrêt total du développement du virus.*

C'est donc ce que nous avons essayé de vérifier.

Or, *cet arrêt du développement n'existe pas* : les passages en série sont parfaitement possibles avec les trois types fondamentaux de particules obtenus en culture pure.

a) *Corps élémentaires.*

Nous en avons effectué le passage en série pendant plusieurs années dans le poumon de la souris avec les deux souches Larufa et Mooser sans jamais observer la moindre modification dans le rythme de multiplication des deux virus (la mort des souris survenant régulièrement entre le 4^e et le 6^e jour).

b) *Corps élémentaires géants.*

Le passage en série des deux souches précédentes sur les épithéliums de la chorio-allantoïde est beaucoup plus difficile en raison de la faible sensibilité de ces épithéliums et du petit

nombre de foyers d'infection cellulaire obtenus, même avec une quantité énorme de particules virulentes.

La culture ne diffuse pas non plus de cellule à cellule au cours du temps par suite du caractère intra-cellulaire très prolongé de l'infection et ce fait contribue encore à réduire le niveau final de culture.

Ceci explique que nous n'ayons pu réussir à maintenir les deux souches dans ces conditions particulièrement difficiles pendant plus de deux ou trois subcultures, par suite de la diminution rapide du nombre des particules d'un passage à l'autre.

Pendant ces quelques passages cependant, ce sont uniquement des corps initiaux que nous avons observés.

c) *Corps rickettsioides.*

Leur passage indéfini peut être réalisé en série sur la chorio-allantoïde avec les souches d'avortement de la brebis en utilisant pour chaque inoculation des membranes qui ne contiennent que des corps rickettsioides : 25 % environ des œufs de subculture ne conduisant alors qu'aux seuls corps rickettsioides.

Les souches du groupe T. P. L. peuvent donc cultiver indéfiniment sous des aspects morphologiques homogènes que nous désignerons donc désormais sous le nom de *phases* (40).

Nous parlerons donc de « phase élémentaire », de « phase des corps géants » ou de « phase rickettsienne » par exemple.

L'ensemble des constatations expérimentales que nous venons de rapporter ne s'accorde nullement avec l'obligation d'un cycle car aucune filiation des divers éléments n'est fondamentalement indispensable.

Chacun des types ou « phases » est, par suite, le parfait équivalent biologique de tous les autres et correspond uniquement à des conditions précises de culture que nous allons maintenant nous efforcer de préciser.

VI. — FACTEURS DE CONTROLE DES DIVERS TYPES MORPHOLOGIQUES

Deux d'entre eux nous ont paru revêtir une importance toute particulière : le type de souche et le tissu utilisé pour les cultures.

a) *Influence du milieu cellulaire de culture.*

C'est le facteur déterminant essentiel car c'est celui grâce auquel il est possible d'agir pour régler, presque à volonté, l'apparition ou la prédominance de l'une ou l'autre des phases.

Le poumon de la souris est, par exemple, l'organe de choix pour la multiplication des corps élémentaires, avec toutes les souches : c'est, en effet, dans cet organe qu'on obtient la plus grande proportion de corps élémentaires.

La membrane choriale de l'œuf est le seul tissu sur lequel nous avons pu obtenir, en culture pure, les corps élémentaires géants (souche Larufa) et les corps rickettsioides (souches d'avortement de la brebis).

Mais il est, peut-être, un exemple qui mérite encore davantage d'être cité pour la démonstration frappante qu'il apporte de l'influence du milieu cellulaire de culture : c'est celui du comportement relatif des *cellules alvéolaires* et des *cellules à poussière* dans le poumon de la souris.

Tandis que les cellules alvéolaires fournissent un nombre considérable de corps élémentaires, ce sont, en effet, presque toujours des corps polymorphes de types divers que l'on rencontre à l'intérieur des cellules à poussière (facilement reconnaissables par ailleurs, aux débris noirâtres qu'elles contiennent).

Cet exemple typique nous montre aussi clairement les renseignements que nous pouvons tirer de la morphologie du virus sur les conditions « de milieu intracellulaire » qui règnent à l'intérieur des cytoplasmes.

UTILISATION DES VIRUS DU GROUPE T. P. L. POUR L'ANALYSE DES MILIEUX CELLULAIRES DE CULTURE

C'est principalement le caractère *homogène* ou *non* des milieux que la morphologie nous indique.

Dans certaines cellules, en effet, le milieu doit être relativement homogène par rapport au virus puisque l'aspect obtenu est régulièrement monomorphe.

D'autres cytoplasmes, au contraire, doivent être beaucoup plus hétérogènes si l'on en juge par la variété des types morphologiques simultanément obtenus.

Trois facteurs nous paraissent capables de contrôler l'homogénéité du milieu cellulaire : un facteur cellulaire, un facteur individuel et un facteur chronologique.

— *Facteur tissulaire.* Les cellules alvéolaires de la souris constituent le prototype des « cellules homogènes » avec leur production presque exclusive des corps élémentaires de 350 m μ .

Parmi les tissus « hétérogènes », on peut citer l'épithélium du sac allantoïque ou le péritoine de la souris, deux tissus où le polymorphisme est constant dès que les cultures y atteignent un certain niveau.

— *Facteur individuel.* Les populations sensibles souris ou

œufs, même originaires de lignées de race pure se révèlent aussi fondamentalement hétérogènes, les variations morphologiques observées pour un même type de tissu étant souvent extrêmement différentes d'un individu à l'autre.

Chez des souris inoculées par voie nasale avec les souches de lymphogranulomatose ou d'avortement de la brebis, on peut, par exemple, rencontrer exclusivement des corps élémentaires ou une association des divers types morphologiques.

Pour les œufs, les variations individuelles sont encore plus nettes : témoins, les œufs inoculés sur la chorio-allantoïde avec les souches d'avortement de la brebis et dont le rendement en corps rickettsioïdes est très irrégulier (1 œuf sur 4 seulement permet de les observer en culture pure).

Dans la membrane vitelline également on obtient une proportion élevée de corps polymorphes avec certains œufs; tandis qu'on observe chez les autres la prédominance terminale habituelle des corps élémentaires.

— *Facteur chronologique.* Il est particulièrement net avec certaines cellules où l'on note une *variation continue* véritablement cyclique, des types morphologiques pendant toute la durée des cultures.

Tel est précisément le cas de la membrane vitelline de l'œuf ou des cellules péritonéales de la souris, ce dont il est facile de se rendre compte en sacrifiant les animaux ou les œufs à des intervalles de temps variables, échelonnés tout au long de la période de culture.

L'importance historique de ces deux tissus est, évidemment, très grande puisque ce sont eux qui ont conduit les classiques à leur description du « cycle évolutif obligatoire » : on y observe bien, en général, la succession des phases décrites dans le cycle, avec l'apparition précoce des corps élémentaires géants et leur remplacement progressif par des corps polymorphes puis par des corps élémentaires.

b) *Variation dans l'aptitude au polymorphisme selon les souches.*

Au cours des passages, certaines souches nous avaient semblé plus volontiers polymorphes. D'autres, à l'inverse, paraissaient conduire à des morphologies beaucoup plus invariables.

Nous n'avons pas voulu nous fier à cette première impression qui pouvait être trompeuse et nous avons repris systématiquement le problème de l'influence des souches sur la morphologie en examinant les huit souches dont nous disposons dans l'ensemble des six principaux tissus de culture.

Cette étude a confirmé l'exactitude de nos constatations ini-

tiales et nous a permis de distinguer des *souches monomorphes* et des *souches polymorphes*. Les premières formant toujours une plus grande proportion de corps élémentaires et les secondes conduisant à une proportion constamment plus élevée des différentes variétés de corps polymorphes.

CLASSEMENT DES SOUCHES SELON LEUR POLYMORPHISME SON INTÉRÊT POUR L'IDENTIFICATION BIOLOGIQUE DES GROS VIRUS

Par simplification, il y avait un intérêt évident, à définir un *tissu unique* comme *critère de polymorphisme*, ce tissu ou cet organe pouvant alors être pris ultérieurement comme test immédiat lors des essais de classification de nouvelles souches.

Le tissu choisi devait avoir deux caractères essentiels :

1° Il devait permettre la culture de *l'ensemble* des souches afin de conférer au procédé un caractère tout à fait général.

2° Les résultats obtenus devaient être d'une grande netteté et correspondre exactement à l'ensemble des constatations faites avec chaque souche dans l'ensemble des tissus sensibles.

C'est pourquoi nous avons finalement retenu le poumon de la souris : toutes les souches du groupe T. P. L. y cultivent, en effet, remarquablement et y donnent la plus grande proportion possible de corps élémentaires : elles y revêtent donc leur caractère le plus nettement monomorphe.

Nous dirons donc désormais qu'une souche est *monomorphe* si elle forme uniquement des corps élémentaires dans le poumon de la souris ; elle pourra être considérée comme *polymorphe*, au contraire, si l'association des corps polymorphes y est extrêmement fréquente.

Les souches « Larufa » et « Mooser » qui nous ont permis de réaliser des cultures pures de corps élémentaires dans le poumon sont donc des souches monomorphes par excellence.

Les souches d'avortement de la brebis ou les souches de lymphogranulomatose vénérienne sont, à l'inverse, des souches polymorphes typiques.

Les souches de psittacose « Bordeaux 56 » et « Weaver Ageon » occupent une position intermédiaire et peuvent être considérées comme moyennement polymorphes.

Deux autres propriétés peuvent, aussi, être envisagées comme des caractères de souche, nous l'avons vu ce sont la *toxicité* et la *virulence*. Nous avons voulu savoir s'il y avait une relation entre l'un ou l'autre de ces deux caractères et l'aptitude des souches au polymorphisme ; nous avons donc comparé le classement des souches selon ces trois propriétés.

On trouvera le résultat de cette comparaison dans un tableau à double entrée (Tableau II) où nous avons classé d'abord les souches selon leur polymorphisme et où nous avons inscrit, ensuite, en regard, les caractères correspondants de virulence et de toxicité.

Il est clair qu'il n'y a aucune correspondance entre la toxicité des souches et leur polymorphisme propre puisqu'on trouve des souches toxiques et non toxiques aussi bien parmi les souches polymorphes que parmi les souches monomorphes.

Le classement par polymorphisme n'a rien à voir non plus avec le classement par virulence puisqu'il n'y a aucune corrélation de rang, directe ou inversée, entre les deux rubriques.

Ce caractère indépendant de l'aptitude au polymorphisme est donc susceptible de rendre de grands services comme *troisième critère d'identification biologique* et doit prendre place à côté des deux caractères différentiels préalablement définis.

<i>Souches</i>	<i>Caractères morphologiques</i>	<i>Toxicité</i>	<i>Virulence</i>
Larufa Mooser	souches monomorphes	élevée faible	moyenne
Avortement LGV	souches polymorphes	faible faible	faible
Bordeaux 56 Weaver Ageon	souches moyennement polymorphes	élevée faible	élevée

Tableau II. - Comparaison de l'aptitude au polymorphisme, de la toxicité et de la virulence propres des souches.

C) LES MECANISMES DE LA DIVISION DES GROS VIRUS LEUR RELATION AVEC LES PHASES

Les procédés cytochimiques nous ont montré les analogies entre les équivalents nucléaires des bactéries, d'une part, les corps élémentaires dans leur ensemble et les granules chromatiques des corps polymorphes, d'autre part, (voir données morphologiques immédiates). Il nous a donc paru indispensable de vérifier également si les corps élémentaires et les granules chromatiques possédaient aussi le deuxième caractère fondamental

qui permet, précisément, de définir les équivalents nucléaires, c'est-à-dire, leur relation avec les mécanismes de la division.

1° *Division des virus du groupe T. P. L. en phase élémentaire.*

Le mode de division est connu dans ce cas de longue date et la bipartition des corps élémentaires est aujourd'hui bien établie.

Toutes les préparations riches en corps élémentaires extra ou intra-cellulaires et tout particulièrement les frottis de poumon de souris ou les frottis de membrane vitelline permettent d'ailleurs de se rendre compte immédiatement de la réalité du processus avec les corps élémentaires les plus typiques : ceux de 350 m μ .

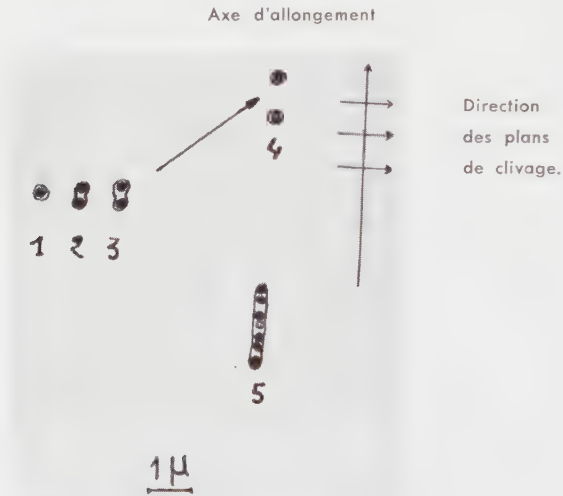


Fig. 8. — Division des virus du groupe T. P. L. en phase élémentaire.

1. — Corps élémentaire au repos.
- 2 et 3. — Bipartition du granule chromatique. Conservation de la membrane capsulaire commune. Formation des diplocorps.
4. — Première éventualité (la plus fréquente), rupture de la membrane capsulaire et séparation des éléments-fils.
5. — Deuxième éventualité (beaucoup plus rare), persistance de la membrane capsulaire pendant plusieurs divisions. Formation d'une véritable chaînette.

Le premier stade correspond à l'allongement et au dédoublement des granules chromatiques qui demeurent encore unis entre eux par un pont colorable légèrement plus fin.

Ce pont colorable ne tarde guère à se rompre mais sans que les granules cessent, pour autant, de rester unis l'un à l'autre

par suite de l'existence de la membrane capsulaire très bien visible avec les éléments extra-cellulaires sur les préparations de contraste à l'encre de Chine.

A ce moment, la division protoplasmique est terminée et les éléments-fils ont réellement acquis leur individualité, la membrane capsulaire étant une formation inerte.

La durée totale du stade protoplasmique doit, d'ailleurs, être extrêmement courte à en juger par la très faible fréquence des figures qui lui correspondent.

Le stade capsulaire qui lui fait suite doit, au contraire, être plus prolongé d'après la fréquence souvent assez élevée des diplo-corps.

C'est pourtant *le stade de repos* entre deux divisions qui doit constituer la période la plus longue de tout le cycle de multiplication, en raison de la prédominance constante et très marquée des corps élémentaires isolés sur tous les frottis en phase élémentaire que l'on examine. Dans certains cas, où le rythme de division des granules est très rapide, et où les frottis ont pu être faits avec de très grandes précautions, on peut observer la formation d'éléments assez nombreux, une dizaine généralement, réunis entre eux par leur membrane capsulaire commune.

Cette éventualité est précieuse car elle nous renseigne sur *l'axe d'allongement* des granules et sur la direction propre de *leur plan de clivage*, indépendamment de toute distorsion due à la cohésion du cytoplasme cellulaire dont l'influence mécanique est prépondérante sur l'apparence des colonies de virus. On voit, en effet, apparaître de véritables chaînettes où les corps élémentaires sont souvent groupés deux par deux du fait de l'alternance d'un espace clair assez court et d'un espace clair plus allongé, cette disposition *linéaire* des éléments suppose obligatoirement la conservation *d'un axe d'allongement identique* d'une division à l'autre des corps élémentaires, *les plans de clivage demeurant, eux-aussi*, invariablement perpendiculaires à cet axe.

2° Division des virus du groupe T. P. L. en phase rickettsienne typique (42).

On peut l'observer avec un maximum de netteté en s'adressant à des frottis monomorphes correspondant à cette phase, c'est-à-dire, principalement, à certains frottis de membrane choriale de l'œuf de poule infecté avec le virus d'avortement des ovins.

Remarquons tout d'abord, sur les frottis, la prédominance des éléments « rickettsiens » *au repos* par rapport aux microorganismes *en division*. Cette constatation permet de penser que la division dans son ensemble est aussi un phénomène relative-

ment rapide pendant la phase rickettsienne comme elle l'était déjà pendant la phase élémentaire. Le stade de repos entre les deux divisions « rickettsiennes » successives doit, au contraire, être relativement long.

Le corps rickettsioïde au repos a déjà été décrit à la rubrique morphologie. Rappelons qu'il mesure en moyenne $1,5 \mu$ de long sur $0,8 \mu$ de large. Il est constitué de deux masses chromatiques polaires séparées par un espace clair central occupé par une dépression bien mise en évidence à l'encre de Chine (les deux masses polaires, plus épaisses après dessiccation, apparaissant

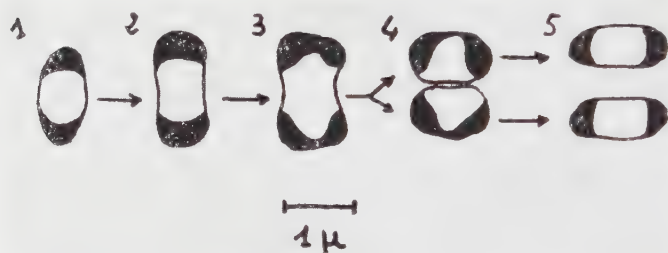


Fig. 9. — Division des gros virus au cours de la phase rickettsienne des cultures. Diagramme représentatif. — 1) Élément caractéristique de la phase rickettsienne au repos. — 2) Allongement de la « rickettsie » avec étirement (transversal) simultané des masses chromatiques polaires. — 3) Constriction centrale du corps rickettsien et début de séparation des granules polaires par migration à la périphérie du germe.. — 4) Fin de la bipartition rickettsienne. Accolement transitoire des éléments-fils. — 5) Fin de la division et retour à la morphologie bipolaire caractéristique.

séparées par une bande intermédiaire un peu plus sombre), et réunies latéralement par deux ponts colorés qui correspondent à la membrane cytoplasmique périphérique.

La division s'effectue comme celle des corps élémentaires par bipartition, le plan de clivage étant transversal par rapport au grand axe de l'élément : la particule virulente s'étire d'abord et s'amincit en son milieu pour se scinder finalement en particules filles absolument équivalentes entre elles.

La cohésion de la membrane capsulaire apparaît, toutefois, moins marquée pendant cette phase que pendant la phase élémentaire car le groupement des particules deux par deux est beaucoup plus rarement observé à la fin de la division qu'on ne le rencontre avec les corps élémentaires.

Il existe cependant et revêt une grande importance pour le mécanisme intime de la division.

La bipartition du virus s'accompagne toujours, de la bipartition simultanée des granules polaires, de sorte que chacun des *corps rickettsioides-fils* retrouve instantanément la morphologie originelle.

Si l'on suit dans le détail l'évolution de la division, on constate, en effet, que l'allongement longitudinal du corps rickettsioïde en division est contemporain d'un étirement des masses polaires qui s'effectue selon un axe transversal par rapport au grand axe de la particule.

Chacune des deux masses chromatiques ainsi étirées s'effile bientôt en son milieu et donne naissance de la sorte à deux masses chromatiques qui commencent à s'éloigner l'une de l'autre par « migration à la périphérie » du germe, tout contre la membrane cellulaire.

Au moment où les corps rickettsioides-fils vont se séparer définitivement, les masses chromatiques-filles se trouvent donc ainsi parfaitement individualisées et on comprend qu'il suffise alors d'un simple allongement des particules virulentes néoformées pour que ces éléments reprennent intégralement leur morphologie bipolaire caractéristique.

L'examen de la figure montre clairement que l'axe d'allongement n'a pas une orientation constante pendant la phase rickettsienne et tourne de 90° d'une division à l'autre des éléments. Le plan de clivage se comporte de même et reste perpendiculaire chaque fois à l'axe de l'allongement.

3° Signification des phénomènes observés au cours des deux phases (44).

Les granules chromatiques des gros virus dont nous connaissons déjà la nature désoxyribonucléique participent donc activement au processus de la division. Leur rôle *d'initiateur* est particulièrement net en phase rickettsienne où la complexité de leur comportement est également la plus grande.

Ces corps colorables possèdent donc bien les propriétés caractéristiques des noyaux des bactéries et méritent l'appellation de *corps de chromatine* réservée par Robinow à leurs homologues bactériens.

Le corps élémentaire des gros virus est presque entièrement réduit à l'état d'un granule isolé de chromatine : chaque corps élémentaire doit être considéré comme un individu *mononucléé* (1) simplifié. A l'inverse, les virus T. P. L. en phase rickettsienne possèdent, au repos, deux corps de chromatine et doivent,

(1) Ou haploïde si on considère le corps de chromatine comme un équivalent chromosomien et non comme un équivalent nucléaire.

par comparaison, être considérés comme de véritables microorganismes *binucléés* (2).

Cette différence de structure des deux types de particules résulte de la présence ou de l'absence d'un décalage dans le temps entre la division protoplasmique et la division nucléaire, décalage toujours possible avec les virus T. P. L. mais qui n'existe pas en phase élémentaire.

Pendant cette phase, en effet, la division protoplasmique suit constamment la division du corps de chromatine et se produit toujours *avant* la division nucléaire suivante.

Pendant la phase rickettsienne, au contraire, la division protoplasmique est *retardée d'une division* par rapport à la division des granules chromatiques, d'où la présence de deux granules caractéristiques.

La répartition de la chromatine entre les éléments-fils est également très différente dans les deux cas : les corps élémentaires-fils héritent de la moitié des DRN de la particule originelle formée par bipartition ; les corps rickettsioides, n'ont pas, au contraire, un héritage en DRN homogène, l'un d'entre eux recevant la totalité des DRN de l'un des granules polaires tandis que l'autre hérite de l'ensemble des DRN de l'autre granule.

Les deux grands types de particules se distinguent donc entre eux, non seulement par l'importance du protoplasme extra-granulaire (ou cytoplasme) mais, encore, par leur structure nucléaire et le comportement des granules de chromatine au cours de la division.

Si l'on ajoute enfin que chaque particule nucléaire peut avoir des dimensions variables à l'intérieur d'une même phase (où il est possible d'observer des variations de diamètre allant du simple au double, les modifications les plus importantes, relativement, étant observées avec les corps élémentaires), on aura une idée de l'extraordinaire plasticité des virus T. P. L. : une modification marquée des masses nucléaires et cytoplasmiques, des changements considérables dans le rapport nucléo-cytoplasmique (très différent en phase élémentaire et en phase rickettsienne), voire un changement radical de structure nucléaire (passage d'un stade mononucléé à un stade à deux granules de chromatine) allant de pair avec la persistance d'un rythme accéléré de multiplication et la conservation de la continuité génétique.

Une autre caractéristique non moins surprenante de ces modifications réside, enfin, dans le déterminisme des phases dont le caractère *adaptatif* est, nous l'avons vu, tout à fait indiscu-

(2) Ou diploïdes si, etc.

table, la structure nucléaire apparaissant ainsi comme directement influencée par les conditions qui règnent dans les milieux cytoplasmiques utilisés pour les cultures.

4° *Structure des autres types de particules virulentes.*

a) *Les formes unipolaires*, si abondantes dans le sac allantoïque de l'œuf de poule embryonné avec les souches typiques de psittacose, constituent également des microorganismes mononucléés comme les corps élémentaires puisqu'elles ne comportent qu'un seul granule de chromatine; elles se différencient pourtant des corps élémentaires par la présence d'une fraction cytoplasmique non négligeable.

Leur division s'effectue en passant par un stade transitoire à deux granules de chromatine avec formation également transitoire d'un véritable corps rickettsioïde bipolaire.

Ces particules se différencient donc de celles observées pendant la phase rickettsienne par *un moins grand retard* de la division cytoplasmique de première division, celle-ci précédant toujours la division nucléaire de seconde division.

Les corps unipolaires apparaissent donc comme de simples variations à l'intérieur de la phase rickettsienne des cultures avec formation transitoire seulement des corps rickettsioïdes, le stade de repos correspondant aux microorganismes unipolaires, de beaucoup les plus nombreux. C'est pourquoi nous réserverons à cette phase l'appellation de *phase rickettsienne incomplète* afin de la distinguer nettement de la phase rickettsienne typique ou complète et par allusion aux corps rickettsioïdes qui apparaissent régulièrement au cours de la division.

b) *Formes multipolaires*. On les observe parfois au cours de processus accélérés de division (dans le sac vitellin, par exemple). Ce sont des particules virales géantes et atypiques, pourvues de granules périphériques de chromatine, à la fois multiples et extrêmement nets, qui obligent à les considérer comme des éléments multinucléés.

Leur formation résulte d'un accroissement dans le retard de la division cytoplasmique par rapport à la division nucléaire. On peut donc légitimement les considérer comme de véritables *formes de division nucléaire* constituées par des granules de chromatine en multiplication périphérique active à l'intérieur d'un cytoplasme en voie de croissance continue mais où se trouvent temporairement bloqués les mécanismes de *division cytoplasmique*.

D) LE PROBLEME DE LA SUCCESSION DES PHASES ET DE LEUR ARTICULATION

Les résultats de notre étude sur le déterminisme des phases ont montré clairement que le type morphologique obtenu au cours d'une culture était *indépendant* du type morphologique originellement inoculé et se trouvait étroitement lié, au contraire, à un véritable état d'équilibre entre les *caractères génétiques de la souche* (aptitude au polymorphisme) et les *conditions de milieu* rencontrées au cours des cultures.

Toutes les filiations sont donc théoriquement possibles et nous avons déjà vu quelques-uns des mécanismes d'articulation des différentes morphologies que nous allons reprendre ici, dans leur ensemble, pour essayer d'en dégager les grandes lignes avec le maximum de simplicité (voir aussi Planche IV, page 104).

1° *Articulation des éléments virulents pourvus d'un cytoplasme (corps unipolaires, bipolaires ou multipolaires).*

Les mécanismes d'articulation sont particulièrement nets dans ce groupe et nous sont indiqués, sans contestation possible par le comportement des éléments au cours de la division : les corps bipolaires sont, en effet, formés, transitoirement au cours de la division des éléments unipolaires, les corps multipolaires au moment de la division des éléments rickettsioïdes.

Le passage de l'un à l'autre de ces éléments paraît donc bien s'effectuer au cours de la division et être conditionné fort simplement par une modification *des rythmes relatifs de la division cytoplasmique et de la division nucléaire.*

Si la division cytoplasmique suit immédiatement la division nucléaire, on assiste à la formation des éléments unipolaires. Si la division cytoplasmique est régulièrement en *retard d'une division* sur la division des granules de chromatine, ce sont les corps rickettsioïdes bipolaires que l'on obtient. Si la division cytoplasmique est en retard de *plusieurs divisions* sur la division des granules de chromatine, on observe l'apparition des éléments multipolaires (dans ce dernier cas, si n est le nombre des granules, r le nombre des retards, on a :

$$r = n - 1.$$

2° *Articulation des éléments à cytoplasme négligeable.*

Ce sont les modifications *des rythmes relatifs de croissance et de division* des granules de chromatine qui conditionnent le passage de l'un à l'autre de trois types morphologiques principaux de ce groupe.

Si la division est extrêmement rapide par rapport au rythme

de croissance, ce sont les corps élémentaires à la limite de la visibilité que l'on rencontre. Si la division des éléments est, au contraire, relativement lente par rapport à leur croissance, ce sont les corps élémentaires géants, de 500 à 600 $m\mu$ que l'on observe.

Dans le poumon de la souris, l'équilibre entre la croissance et la division des particules aboutit à un type intermédiaire, régulièrement calibré : celui des corps élémentaires de 350 $m\mu$.

Plaques.

Si la division est pratiquement suspendue par rapport à la croissance, on voit enfin apparaître les plaques uniformément colorées.

Si, ultérieurement, la division reprend au niveau des plaques, on va assister à leur fragmentation et au retour à des formes virulentes plus petites.

Ordinairement, d'ailleurs, cette diminution de volume des plaques en cours de division ne s'effectue pas par bipartition régulière *mais par un véritable « bourgeonnement » périphérique multiple*, qu'il est assez souvent possible de saisir, notamment avec les appositions de membrane vitelline. Ce procédé permet, en effet, d'étudier la paroi cytoplasmique extrêmement mince des gigantesques sacs vacuolaires que sont les cellules entoblastiques de l'œuf.

On obtient ainsi des préparations particulièrement favorables à l'observation des particules en place, c'est-à-dire de véritables instantanés des modes de division.

3° Passage des types morphologiques pourvus d'un cytoplasme aux types morphologiques à cytoplasme négligeable.

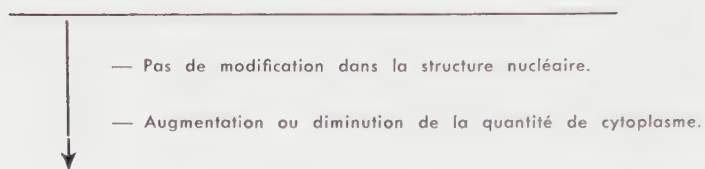
Ce passage peut être envisagé également avec simplicité comme une modification du *rythme relatif* de la *croissance cytoplasmique* et de la *croissance nucléaire*.

Si la croissance nucléaire est relativement la plus rapide, ce sont les éléments à cytoplasme négligeable que l'on observe; ce sont les éléments pourvus d'un cytoplasme nettement visible qui se trouvent formés dans le cas contraire.

Quatre facteurs liés à la division et à la croissance (la croissance cytoplasmique et la croissance nucléaire, la division cytoplasmique et la division nucléaire) *régissent donc les aspects morphologiques divers des virus du groupe T. P. L. par suite de leur indépendance relative et des dissociations possibles de leur rythme.*

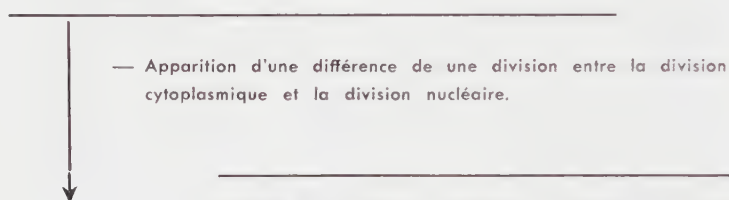
L'évolution relative de ces quatre facteurs et les aspects morphologiques correspondants sont exposés dans le *tableau III* et la figure 10.

Passage de la phase élémentaire à la phase rickettsienne incomplète.



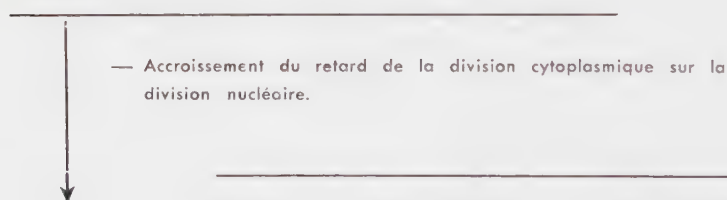
Passage de la phase rickettsienne incomplète à la phase élémentaire.

Passage de la phase rickettsienne incomplète à la phase rickettsienne complète.



Passage de la phase rickettsienne complète à la phase rickettsienne incomplète.

Passage de la phase rickettsienne complète à la phase multipolaire.



Passage de la phase multipolaire à la phase rickettsienne complète.

Fig. 10. — 1. Processus de multiplication en phase élémentaire. →
 2. Processus de multiplication en phase rickettsienne incomplète.
 3. Processus de multiplication en phase rickettsienne complète.
 4. Accroissement du nombre des granules chromatiques en phase multipolaire.

CARACTÉRISTIQUES DES PHASES



1

Phase élémentaire

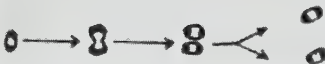
- granule de chromatine unique au repos.
- à peu près pas de cytoplasme.



2

Phase rickettsienne incomplète

- granule de chromatine unique au repos.
- présence d'une fraction cytoplasmique non négligeable.



3

Phase rickettsienne complète

- 2 granules chromatiques polaires au repos.
- Présence de cytoplasme.



4

Phase multipolaire

- granules chromatiques multiples au repos.
- beaucoup de cytoplasme.

LES DEUX GRANDS GROUPES	CARACTÈRE DIFFÉRENTIEL DES 2 GROUPES : <i>LA CROISSANCE CYTOPLASMIQUE</i>	TYPES MORPHOLOGIQUES A L'INTÉRIEUR DES GROUPES	VITESSE DE DIVISION NUCLÉAIRE (Gr. I) ou RETARD DE DIVISION CYTOPLASMIQUE Gr. II	CARACTÈRE DIFFÉRENTIEL A L'INTÉRIEUR DES GROUPES
Éléments à cytoplasme négligeable (Groupe I)	Très faible entre deux divisions	Corps élémentaires très fins	++++	Vitesse progressivement décroissante de la division nucléaire par rapport à la croissance nucléaire
		Corps élémentaires 350 m μ	+++	
		Corps élémentaires géants	+	
		Plaques	0	
Éléments à cytoplasme non négligeable (Groupe II)	Importante entre deux divisions	Corps unipolaires	$r = 0$	Retard progressivement croissant de la division cytoplasmique par rapport à la division nucléaire
		Corps bipolaires	$r = 1$	
		Corps multipolaires	$r > 1$	

TABLEAU III. — Les mécanismes d'articulation
des différents types morphologiques

QUATRIEME PARTIE

DISCUSSION

On connaît les variations des bactéries et on possède quelques données sur la *signification biologique* des formes L ou des spores, par rapport aux types morphologiques habituels : on sait, par exemple, que les spores sont des formes de résistance des germes et que les formes L apparaissent dans des conditions de milieu qui rendent impossible la multiplication des types morphologiques habituels.

Aussi nous a-t-il paru insuffisant de connaître l'existence des variations morphologiques des gros virus, leur déterminisme immédiat et leur mécanisme d'articulation; et nous nous sommes demandé quelle pouvait être aussi leur signification propre et si cette signification était voisine de celle des variations morphologiques des autres microorganismes.

A) SIGNIFICATION DES VARIATIONS MORPHOLOGIQUES DES VIRUS DU GROUPE T. P. L.

L'analyse des *phénomènes* de la division et de ceux relatifs à l'articulation des phases nous a montré l'existence de *troubles maturatifs* indéniables au cours du développement des gros virus.

On ne peut, en effet, interpréter autrement les trois phénomènes fondamentaux qui régissent le comportement relatif des équivalents nucléaires et cytoplasmique des gros virus et auxquels se ramène en définitive l'ensemble des faits :

1° L'inhibition possible de la croissance cytoplasmique (observée avec les corps élémentaires géants ou les plaques).

2° Le ralentissement plus ou moins important de la division des équivalents nucléaires par rapport à leur croissance (que l'on constate avec les formes pauvres en cytoplasme).

3° Le retard variable de la division cytoplasmique sur la division nucléaire (qu'il est possible de voir avec les formes à cytoplasme non négligeable).

Nous ajouterons encore à ces trois groupes de faits, les données relatives à la vitesse globale de développement des gros virus dont la convergence est assez remarquable avec eux : croissance et division ne sont, en effet, que deux aspects d'un même phénomène, la *synthèse du protoplasme des éléments vivants* sur

laquelle, précisément, l'étude du rythme de développement nous renseigne dans son ensemble.

Nous avons déjà noté ailleurs le développement extrêmement lent des gros virus chaque fois qu'ils se présentent à nous sous la morphologie des corps élémentaires géants ou des plaques, et, par contraste, la rapidité extraordinaire de développement des corps élémentaires.

En première approximation, on peut donc considérer les corps élémentaires géants ou les plaques comme liés à des difficultés indéniables de culture, les corps élémentaires de dimensions plus petites ou égales à 350 m μ paraissant correspondre, au contraire, à des conditions particulièrement favorables de développement.

En ce qui concerne les *corps polymorphes* à cytoplasme non négligeable, ils paraissent, de ce point de vue, occuper une position intermédiaire : ils sont, en effet, obtenus seulement avec les souches les plus virulentes ou les mieux adaptées dans des tissus où les autres souches se multiplient avec difficulté et ne permettent d'obtenir que des vitesses de développement extrêmement réduites.

Ainsi, les souches d'avortement de la brebis qui se multiplient assez bien dans l'épithélium chorial de l'œuf conduisent électivement à des corps rickettsioïdes dans des conditions où la souche Larufa donnait uniquement des corps initiaux et traduisait par conséquent d'incontestables difficultés de culture.

Ainsi, les souches de psittacose « Bordeaux 56 » et « Weaver Ageon », dont la virulence est élevée, ont un polymorphisme extraordinaire dans le sac allantoïque où la souche Mooser moins virulente, fournit seulement des corps initiaux.

Ces constatations nous amènent donc à envisager les corps polymorphes comme la forme de multiplication active des virus du groupe T. P. L. dans des conditions de milieu relativement difficiles et qui ne permettent pas le développement des corps élémentaires.

Les modifications morphologiques observées correspondent alors à un trouble maturatif certain mais insuffisant pour ralentir nettement la vitesse de multiplication des germes.

Il nous semble donc logique de définir finalement trois phases morphologiques principales des virus du groupe T. P. L.

1° *La phase des corps élémentaires géants* (et des plaques);

2° *La phase polymorphe* et,

3° *La phase élémentaire,*

chacune de ces phases principales pouvant, bien entendu, se subdiviser en un certain nombre de types morphologiques dont nous avons précisé le mécanisme et sur lesquels nous ne reviendrons pas davantage.

B) SIGNIFICATION DU « CYCLE FACULTATIF » DES GROS VIRUS

La séparation des types morphologiques en culture pure ne signifie pas qu'il n'y a *jamais* de cycle évolutif des gros virus mais, simplement, qu'il n'y a pas de cycle *obligatoire*.

Dans certains tissus, en effet, nous l'avons déjà noté, on observe bien un véritable cycle, notamment dans le péritoine de la souris ou la membrane vitelline de l'œuf, voire les cellules de la conjonctive du trachomateux.

Nous décrivons ici celui que l'on observe *dans le sac vitellin* parce qu'il peut être suivi avec une plus grande commodité dans la pratique et nous prendrons comme type le développement de la souche Mooser de *pneumonie de la souris* (voir Planche III, pages 102 et 103).

Le procédé que nous emploierons pour suivre l'évolution du cycle est analogue à celui utilisé par Bedson et Bland en 1930 chez la souris et qui consistait à faire une succession de frottis au cours du temps. Nous avons donc inoculé dans le jaune un assez grand nombre d'œufs embryonnés au 7^e jour de leur culture puis nous avons sacrifié des groupes d'œufs à des temps variables, ceci, afin d'échapper aux variations individuelles des cultures, enfin, nous avons examiné les frottis ou les appositions des membranes vitellines correspondantes. Ce sont les résultats moyens de nos constatations faites sur plusieurs œufs simultanément qui se trouvent rapportés ici.

Nous sommes partie d'une morphologie unique au départ afin d'éviter les variations expérimentales liées au type morphologique original, afin aussi de travailler dans des conditions homogènes : ce sont des suspensions de corps élémentaires en culture pure que nous avons utilisées; elles correspondaient à des broyats de poumons de souris infectés.

Aussitôt après inoculation dans le sac du jaune, on trouve des corps élémentaires dans les frottis, mais avec une certaine difficulté déjà, du fait de la diffusion dans le jaune.

Après 24 heures, il n'y a pratiquement plus d'éléments virulents visibles et l'on entre ainsi dans la *phase latente* des cultures; la disparition des éléments tient, pendant cette phase, à une inactivation progressive des germes qui n'ont pas été capables de pénétrer dans les cellules de la membrane vitelline ou de s'y multiplier.

Vers le 2^e ou 3^e jour, on voit réapparaître les éléments virulents sous forme de corps élémentaires géants dont le nombre et les dimensions augmentent progressivement.

C'est alors qu'apparaissent les plaques qui coexistent d'ailleurs encore avec les corps élémentaires géants.

On peut ensuite observer le bourgeonnement des plaques en même temps qu'apparaissent des éléments polymorphes nombreux à cytoplasme nettement visible : corps unipolaires, corps rickettsioïdes ou multipolaires.

Enfin apparaissent peu à peu les corps élémentaires dont le nombre va régulièrement augmenter et devenir bientôt considérable. On assiste, en même temps, à la disparition des corps polymorphes, des plaques et des corps élémentaires géants.

Vers le 7^e-8^e jour, il ne reste pratiquement plus que des corps élémentaires dont les dimensions sont égales ou inférieures à 350 m μ et dont le nombre est tout à fait extraordinaire.

Il y a donc eu dans le sac vitellin, la phase de latence mise à part, trois phases successives de culture qui correspondent exactement à celles précédemment définies et qui se succèdent dans un ordre nettement déterminé.

1° *Une phase initiale lente et difficile*, correspondant aux corps élémentaires géants et aux plaques.

2° *Une phase secondaire* de croissance nettement plus accélérée mais où la persistance des troubles maturatifs entraîne la formation des *corps polymorphes*.

3° *Une phase terminale enfin* de multiplication extrêmement active, sans troubles maturatifs des virus, et où il se forme uniquement des *corps élémentaires*.

C'est par conséquent bien à une véritable modification progressive des conditions de culture dans la membrane vitelline à laquelle nous avons assisté au cours du cycle ainsi que le soupçonnait originellement Levinthal — comme si l'accumulation progressive du virus entraînait, par un véritable *effet de masse* la « diminution progressive de résistance » invoquée par cet auteur.

C) COMPARAISON ENTRE LES PHASES DES VIRUS DU GROUPE T. P. L. ET LES VARIATIONS MORPHOLOGIQUES DE QUELQUES AUTRES MICROORGANISMES

Nous procéderons « du plus simple au plus compliqué » et nous commencerons par les microorganismes les plus proches : nous envisagerons donc d'abord les Rickettsies en raison d'un caractère commun entre elles et les virus du groupe T. P. L., celui d'être des parasites intra-cellulaires obligatoires.

1° COMPARAISON AVEC LE GROUPE DES RICKETTSIES

On peut également observer trois stades morphologiques bien différents avec les Rickettsies, selon les souches et selon le milieu cellulaire de culture.

Le type classique correspond à peu près au corps élémentaire des gros virus mais s'en distingue par sa forme non plus arrondie mais allongée. Les Rickettsies ont alors des dimensions comprises entre 0,3 et 0,5 μ de large sur 1 à 1,5 μ de long.

Ce type morphologique est constamment obtenu, dans la vaginale du cobaye, avec les souches rickettsiennes épidémique, murine et boutonneuse ou, dans la rate, avec *R. burneti* dont les dimensions, chez l'animal, sont les plus ténues. Il est aussi constant dans le sac vitellin de l'œuf avec chacune des précédentes souches, les dimensions des germes et leur nombre étant, par ailleurs, beaucoup plus considérables.

Le type bipolaire est la règle avec certaines souches extrêmement polymorphes, comme celles du groupe oriental, quel que soit le tissu utilisé pour les cultures; on observe parfois aussi quelques aspects unipolaires avec ce germe.

La morphologie bipolaire ne se rencontre, à l'inverse, jamais avec les souches les plus monomorphes comme *R. conori*.

Elle se constate électivement avec *R. mooseri* et *R. prowazeki* dans le poumon des rongeurs inoculés par voie aérienne.

Les éléments géants ont été décrits par P. Giroud dans le poumon du lapin avec les cultures pauvres du groupe des typhus (*R. prowazeki*, *R. mooseri*) sous le nom de « corps homogènes » et de « corps granuleux » qui peuvent atteindre et dépasser 2 et 3 μ . Ils paraissent correspondre soit aux plaques de la psittacose soit à de véritables formes multipolaires selon leur aspect après hydrolyse chlorhydrique ménagée : celle-ci leur conserve, en effet, dans le premier cas, un aspect homogène et fait apparaître dans le second des masses chromatiques multiples qui se différencient toutefois de celles des virus du groupe T. P. L. par leur disposition beaucoup moins nettement périphérique.

On retrouve donc bien avec les Rickettsies les trois phases principales des virus du groupe T. P. L. et l'influence de la souche et du milieu de culture sur le déterminisme des phases.

La phase géante est contemporaine de la croissance la plus lente et la plus difficile dans le poumon du lapin inoculé avec une quantité insuffisante de germes.

La phase bipolaire traduit un trouble maturatif qui doit être considéré comme un caractère de souche avec *R. tsutsugamuchi* (dont la multiplication est de beaucoup la plus lente dans tout le groupe) ou comme une persistance relative des difficultés de

croissance rencontrées dans le poumon des rongeurs (*R. mooseri*, *R. prowazeki*).

La phase élémentaire correspond à la forme élective de multiplication des rickettsies comme à celle des gros virus.

2° COMPARAISON AVEC LES GERMES DU GROUPE DE LA PÉRIPNEUMONIE

Il s'agit, cette fois, de germes dont le caractère parasite est beaucoup moins marqué que celui des Rickettsies ou des gros virus puisqu'on peut les obtenir *in vitro* sur des milieux solides ou dans les milieux liquides.

Ces microorganismes jouent cependant un rôle de transition entre les Rickettsies et les gros virus, parasites obligatoires des cellules vivantes, et les bactéries car ils sont susceptibles de revêtir un caractère de *parasitisme épicellulaire facultatif* tout à fait remarquable.

On connaît assez bien les variations morphologiques de ce groupe et les conditions de milieu qui les régissent. On peut, en effet, distinguer un stade élémentaire, un stade des corps élémentaires géants et un stade véritablement monstrueux.

Les corps élémentaires, très polymorphes et dont le diamètre est compris entre 250 et 350 $m\mu$, se rencontrent *in vitro* dans les cultures en milieu liquide pendant la phase logarithmique de croissance ou *in vivo*, dans les cultures massives. On les trouve, par exemple, chez la souris avec le microorganisme de Herzberg dans les cultures massives obtenues au niveau des alvéoles.

Les corps élémentaires géants, de 500 à 600 $m\mu$, sont particulièrement nets également avec ce germe dans les cultures limitées à la surface des cellules bronchiques de la souris, c'est-à-dire pendant la *phase épicellulaire* de croissance.

On peut également observer dans ces conditions un véritable bourgeonnement des corps élémentaires géants à leur pôle le plus éloigné de la cellule. Ce bourgeonnement rappelle celui des plaques de la psittacose — mais il aboutit à de véritables filaments dont la rupture ultérieure, plus ou moins précoce, donnera naissance aux premiers corps élémentaires.

Les formes monstrueuses qui peuvent atteindre plusieurs μ s'observent enfin, *in vitro* sur les milieux solides : on peut distinguer alors à l'intérieur des germes un cytoplasme bleuté au Wright et des granules chromatiques internes souvent très volumineux.

On constate, par conséquent, une nouvelle fois la présence de trois phases morphologiques distinctes :

— *une phase élémentaire* de prolifération logarithmique active,

— *une phase de prolifération relativement active* mais associée à des *troubles maturatifs* particulièrement intenses (celle des formes monstrueuses),

— *une phase enfin de multiplication lente* avec apparition des corps élémentaires géants.

L'étude comparée des gros virus d'une part, des Rickettsies et des microorganismes du groupe de la péripneumonie d'autre part a donc finalement un double intérêt :

1° *Elle nous démontre tout d'abord le caractère relativement général des phénomènes de transformation morphologique.*

2° *Elle nous achemine ensuite vers des groupes de germes dont le caractère parasitaire n'a plus rien d'obligatoire.*

On se trouve ainsi tout naturellement conduit à envisager la comparaison des phases des gros virus avec les transformations morphologiques des bactéries que nous étudierons beaucoup plus longuement parce qu'elles sont aujourd'hui les mieux connues et les plus classiques.

3° LES « PHASES MORPHOLOGIQUES » DES BACTÉRIES ET LES « PHASES MORPHOLOGIQUES » DES GROS VIRUS

a) *Définition et description des transformations morphologiques des bactéries.*

Le « cycle L » comporte deux phases morphologiques distinctes : *la phase élémentaire* et *la phase bactérienne*, articulées entre elles par le stade de transition des *corps globuleux*.

La phase bactérienne correspond à la morphologie classique des bactéries dans les milieux usuels de culture.

Elle se caractérise par des dimensions relativement grandes et une structure assez complexe comportant un ou plusieurs équivalents nucléaires et un cytoplasme.

La phase élémentaire est caractérisée par la prolifération de microorganismes extrêmement fins (encore appelés « formes L » en l'honneur de l'Institut Lister où elles ont été découvertes) et très analogues par leur morphologie et par leur taille aux corps élémentaires des péripneumonies.

Ces corps élémentaires peuvent être interprétés comme des germes pratiquement réduits à l'état de granules isolés de chromatine. On les observe secondairement dans les milieux de culture défavorables à la croissance bactérienne et, notamment,

après addition de pénicilline, procédé désormais classique pour leur séparation en culture pure.

Les corps globuleux s'apparentent aux formes monstrueuses des péripneumonies et possèdent ordinairement plusieurs granules de chromatine dispersés à l'intérieur d'une masse cytoplasmique géante.

Ils précèdent, en règle générale, l'apparition des corps élémentaires dans les milieux contenant un inhibiteur de croissance, actif sur la forme normale des bactéries.

b) *Rapports mutuels des types morphologiques des bactéries.*

Ils peuvent se résumer, dans ce qu'ils ont d'essentiel sous deux rubriques fondamentales.

1° Dans chacune de leurs phases, les bactéries conservent intactes leurs *potentialités génétiques*, c'est-à-dire leur aptitude à se reproduire.

2° Les corps élémentaires s'individualisent par des différences marquées de taille et de structure, le corps élémentaire, nettement plus petit et morphologiquement moins complexe, paraissant une sorte de *particule plus ou moins simplifiée*.

3° Le passage de l'un à l'autre des types dépend de façon prépondérante pour une souche donnée *des conditions* de milieu rencontrées par les cultures.

Ces trois caractères fondamentaux sont exactement *ceux qui définissent les rapports des transformations morphologiques des virus du groupe T. P. L.*

C'est pourquoi nous avons finalement étendu aux gros virus le concept des transformations morphologiques désormais classique en bactériologie et pourquoi nous avons proposé de considérer les corps élémentaires des virus du groupe T. P. L. comme de véritables « formes L » des microorganismes plus volumineux et plus complexes que sont les corps polymorphes, les corps élémentaires géants et les plaques assumant assez bien le rôle de transition joué par ailleurs par les corps globuleux des bactéries.

Par analogie avec les transformations L des bactéries nous pouvons donc parler des deux phases principales des virus visibles : la « *phase L* » (ou « *élémentaire* » et « *la phase R* » (ou « *polymorphes* »). Cette dernière phase étant ainsi désignée pour rappeler sa parenté morphologique avec les Rickettsies.

Cependant, s'il existe des caractères communs au « cycle R » des gros virus et au « cycle L » des bactéries, c'est-à-dire entre les deux types de transformations morphologiques, il est nécessaire de ne pas se borner à une comparaison superficielle des

deux cycles et d'en préciser le plus exactement possible les analogies et les différences.

c) *Analogies et différences entre la transformation L des bactéries et la transformation R des gros virus.*

1° *Analogies.* Comme les bactéries, les gros virus conservent intactes leur antigénicité et leurs exigences de culture au cours de leurs transformations.

Antigénicité.

Chaque fois que nous avons pu obtenir une culture assez abondante pour que la concentration de nos antigènes soit élevée, nous n'avons jamais pu observer de variations dans l'*antigénicité active* ou *passive* des différents types morphologiques : nous avons donc pu employer indifféremment en fixation du complément des antigènes et des sérums préparés à partir de matériel virulent provenant du sac vitellin, du sac allantoïque ou du poumon de la souris sans jamais voir disparaître le caractère antigénique de groupe des virus T. P. L.

Conservation des exigences de culture.

Les gros virus sont demeurés parasites obligatoires des cellules vivantes avec tous les types morphologiques observés et de façon tout à fait indépendante du nombre des passages effectués sans modification de morphologie. Cette conservation du caractère distinctif du grand groupe des Rickettsiales, auquel appartiennent les virus T. P. L. entraîne à son tour quelques différences avec le « cycle L » des bactéries.

2° *Divergences entre les deux types de « transformation » : « le type bactérien » et « le type viral ».*

POUVOIR PATHOGÈNE

Les virus du groupe T. P. L. conservent l'*intégralité* de leur pouvoir pathogène en phase élémentaire tandis que les bactéries en phases L perdent ordinairement le leur (certains vibrions se comportent, toutefois, de ce point de vue comme les gros virus).

Le pouvoir infectant de nos souches ne s'est pas modifié le moins du monde après un long passage sous forme élémentaire ou polymorphe : nous avons donc pu procéder à tout moment à leur caractérisation biologique sans être aucunement gênée par le mode de culture utilisé pour les entretenir.

SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

La sensibilité des gros virus aux antibiotiques ne se modifie pas non plus au cours des transformations L : sous leurs divers aspects morphologiques, ils demeurent, en effet, insensibles *in vivo* à la pénicilline et à la streptomycine. Le chloramphénicol entraîne un simple ralentissement de leur culture tandis que la Rovamycine d'une part, le groupe des Tétracyclines de l'autre bloquent complètement leur multiplication. C'est ce que nous avons vérifié principalement avec le virus d'avortement de la brebis en procédant à des tentatives de culture dans le poumon de la souris (prédominance usuelle des corps élémentaires) ou sur l'épithélium chorial de l'œuf (présence des corps rickettsioides).

Les bactéries, au contraire, perdent en phase L leur sensibilité à la pénicilline et deviennent sensibles au groupe des Tétracyclines.

Mais ce qui oppose le plus nettement les gros virus aux bactéries c'est :

LA RÉVERSIBILITÉ ABSOLUE DES PHASES

Même après un passage extrêmement prolongé en phase élémentaire ou en phase polymorphe, on peut toujours revenir, avec toutes les souches, à d'autres types morphologiques de culture par un simple changement dans les tissus inoculés.

Nous avons vérifié ce fait avec la souche Larufa et la souche Mooser *après plusieurs années* de passage dans le poumon de la souris (c'est-à-dire en phase élémentaire) en effectuant à nouveau des inoculations sur la membrane chorale de l'œuf ou dans le sac allantoïque : dès le premier passage, nous avons vu disparaître les corps élémentaires et réapparaître les corps élémentaires géants, caractéristiques du nouveau tissu.

Avec les souches d'avortement de la brebis, entretenues sur l'épithélium chorial par passages en série de corps rickettsioides, nous sommes revenus aussitôt aux corps élémentaires par simple inoculation dans le poumon de la souris.

Pour les bactéries, au contraire, si l'on peut obtenir *assez souvent* mais *non toujours* des « formes L » aux dépens de germes à morphologie classique, il est, en général, beaucoup plus difficile *de revenir* à la phase bactérienne originelle. C'est pourquoi on considère généralement les microorganismes du type péripleumonique comme de véritables « formes L » *définitivement fixées*.

SIGNIFICATION DE L'APPARITION DES CORPS ÉLÉMENTAIRES
DANS LES DEUX GROUPEs

Il y a enfin, de ce point de vue, une opposition nette entre les deux groupes : *avec les bactéries*, en effet, on observe le passage en phase élémentaire simplifiée *dans les conditions de culture les plus difficiles* (c'est-à-dire en présence d'inhibiteurs). Ce sont au contraire, des éléments morphologiquement plus complexes qui se forment précisément, dans ce cas, avec les gros virus.

RÉSUMÉ
ET CONCLUSION

Nous avons entrepris l'étude microscopique de 8 souches de virus du groupe Trachome - Psittacose - Lymphogranulomatose vénérienne, appartenant à 5 sous-groupes biologiques distincts (2 souches de psittacose, 1 souche d'ornithose et 1 souche de pneumonie de la souris, 1 souche de lymphogranulomatose vénérienne et 3 souches d'avortement de la brebis).

Toutes ces souches ont fait l'objet de cultures *in vivo* dans des cellules très différentes, afin d'extérioriser au maximum leurs potentialités évolutives; c'est ainsi que nous avons notamment inoculé des souris par les voies péritonéale, nasale ou transcrânienne et que nous avons infecté des œufs au niveau des membranes choriale, allantoïque ou vitelline.

Pour chacune des variantes de culture, nous avons fait d'innombrables frottis et nous les avons étudiés très longuement et très soigneusement au microscope après coloration par deux procédés que nous avons mis au point et qui utilisent l'un et l'autre le colorant de Wright.

Nous avons aussi examiné des cultures spontanées de virus trachomateux au niveau de la conjonctive humaine ou de virus d'avortement dans les cotylédons placentaires de la brebis.

Dans l'ensemble, les particules virales du groupe T. P. L. semblent répondre à deux grandes catégories, les corps élémentaires et les corps polymorphes qui diffèrent nettement entre eux par leur taille d'abord (inférieure à $350\text{ m}\mu$ pour les corps élémentaires, supérieure à $350\text{ m}\mu$ pour les éléments polymorphes) mais aussi par leur morphologie — les corps polymorphes se singularisent, en effet, par la variabilité considérable de leurs types.

Les « corps initiaux » de Bedson et Bland, sorte de corps élémentaires géants de 500 à $600\text{ m}\mu$ occupent une position intermédiaire et se rapprochent des corps élémentaires par leur morphologie, des corps polymorphes par leur taille.

Nous n'avons pas voulu rester à ce stade purement descriptif et nous avons voulu essayer d'interpréter sur des bases expérimentales les données morphologiques immédiatement obser-

vables : nous avons pu ainsi établir un certain nombre de points.

1° Les gangues, formations colorables qui peuvent atteindre plusieurs μ et que l'on observe si fréquemment avec les virus du groupe T. P. L., sont, en fait, non des particules de virus, mais des formations cellulaires réactionnelles, correspondant à de véritables nécroses par coagulation, elles-mêmes déclenchées par la pénétration des particules virales, infectantes ou non, à l'intérieur du cytoplasme des cellules.

Elles se forment, avec les virus T. P. L., électivement au niveau des monocytes.

2° Contrairement aux conceptions des classiques, le corps élémentaire n'est pas obligatoirement la seule particule virale réellement libérée par les cellules : il peut aussi être associé à des variétés diverses de corps polymorphes.

3° On peut obtenir *en culture pure* trois types fondamentaux de particules de virus :

— les corps élémentaires que nous avons obtenus dans le poumon de la souris,

— les corps élémentaires géants que nous avons observés avec deux souches dans la membrane chorio-allantoïde

— et les « corps rickettsioides », variété de corps polymorphes qui apparaît dans les cellules de l'épithélium chorial de l'œuf de poule avec le virus d'avortement de la brebis.

4° Grâce aux trois types morphologiques fondamentaux artificiellement isolés, nous avons pu constater le pouvoir infectant homogène des différentes particules virales, indépendamment de leur morphologie et de leur situation, intra- ou extra-cellulaire.

Pour les corps rickettsioides qui ressemblent étonnamment aux rickettsies du groupe oriental, cette démonstration est importante car ils ont été considérés à tort depuis Levinthal avec les autres variétés de corps polymorphes comme des « formes d'involution » ou « de dégénérescence ».

5° La transmission indéfinie ou prolongée possible de chaque type de particules, obtenu en culture pure, démontre enfin l'équivalence biologique absolue des types morphologiques ce qui nous a conduit à rejeter l'obligation du « cycle évolutif des virus du groupe T. P. L. universellement admise jusqu'à ce jour.

6° Le déterminisme des différents types morphologiques paraît relever de deux influences prépondérantes :

— celle du milieu cellulaire de culture où nous avons pu voir un facteur individuel, un facteur cellulaire et un facteur chronologique

— et celle des souches, certaines d'entre elles étant plus

volontiers monomorphes et d'autres plus volontiers polymorphes.

7° Nous avons alors étudié les phénomènes de la division des gros virus et leur relation avec les types morphologiques ou phases.

— Nous avons ainsi pu confirmer la bipartition des corps élémentaires et la conservation de leur axe d'allongement au cours des divisions successives, les plans de clivage étant régulièrement perpendiculaires à cet axe.

— En phase rickettsienne typique, la division des virus du groupe T. P. L., jamais décrite jusqu'à ce jour, apparaît beaucoup plus complexe.

Elle s'effectue aussi par bipartition mais l'axe d'allongement tourne de 90° d'une division à l'autre, le plan de clivage demeurant chaque fois perpendiculaire à cet axe.

8° Après avoir constaté, grâce au test de Brachet à la Ribonucléase, d'une part, au test de Piékariski-Robinow avec hydrolyse chlorhydrique ménagée, d'autre part, que les corps élémentaires des gros virus et les granules chromatiques des corps polymorphes correspondent à des structures désoxyribo-nucléïques, nous avons pu établir le rôle initiateur de ces structures dans les phénomènes de la division, auxquels les granules de chromatine participent activement : nous avons pu ainsi les définir comme de véritables équivalents nucléaires (ou chromosomiens) tout à fait analogues à ceux observés chez les bactéries.

9° Nous avons alors pu considérer les corps élémentaires comme de véritables individus mononucléés (ou haploïdes) simplifiés, réduits pratiquement au seul granule de chromatine.

A l'inverse, les virus en phase polymorphe peuvent être considérés comme des individus plus complexes pourvus d'un cytoplasme et d'un nombre variable d'équivalents nucléaires (ou chromosomiens).

10° Quatre facteurs relatifs à la division et à la croissance (croissance cytoplasmique et croissance nucléaire d'une part, division cytoplasmique et division nucléaire de l'autre) régissent donc les transformations morphologiques des virus du groupe T. P. L. par la dissociation possible de leur rythme sous l'influence des troubles maturatifs observés dans certains tissus.

11° Nous avons donc essayé de classer les éléments selon le type et l'intensité des troubles maturatifs :

— les corps élémentaires semblent correspondre à des conditions de développement particulièrement favorables et à un rythme de division tel que la croissance nucléaire reste faible et que la croissance cytoplasmique est négligeable;

— les corps élémentaires géants et les plaques (formations

virales volumineuses et de coloration homogène), au contraire, s'observent dans les conditions de développement les plus difficiles où la croissance cytoplasmique est inhibée et où le rythme de division est particulièrement lent;

— les corps polymorphes occupent une position intermédiaire avec leur vitesse de division relativement rapide et la production d'une quantité appréciable de cytoplasme mais il y persiste un retard plus ou moins net de la division cytoplasmique sur la division nucléaire.

12° Le « cycle facultatif » des gros virus tel qu'on le constate dans les cellules de la membrane vitelline correspond à une modification progressive des conditions de culture, ainsi que le soupçonnait originellement Levinthal, comme si l'accumulation progressive du virus entraînait, par un véritable « effet de masse » une véritable « diminution progressive de résistance ».

13° Nous avons alors comparé les notions acquises sur le développement des gros virus avec les données antérieurement connues pour les Rickettsies ou les microorganismes du groupe de la péripneumonie.

Nous avons pu ainsi apercevoir le caractère relativement général des phénomènes de transformation morphologique et nous acheminer peu à peu des germes obligatoirement parasites comme les virus du groupe T. P. L. et les Rickettsies, vers des germes dont le caractère de parasites épicyellulaire n'a plus rien d'obligatoire (péripneumonies).

14° Nous avons de la sorte été conduite à comparer les transformations morphologiques des gros virus et le cycle L des bactéries.

La phase élémentaire des gros virus nous a paru correspondre à la phase élémentaire, ou « forme L », des bactéries, la phase rickettsienne (ou polymorphe) des virus T. P. L. à la phase bactérienne normale; les corps initiaux et les plaques à ces formes de transition que sont les « corps globuleux » du « cycle L ».

15° Nous avons, toutefois, poussé plus loin l'analyse et nous avons montré qu'il existait entre le cycle L des bactéries et le « cycle R » des gros virus (ainsi appelé pour évoquer l'apparition des éléments de type rickettsien) des analogies et des différences :

Les analogies sont au nombre de 5 : relation entre les transformations observées et les conditions de milieu rencontrées au cours des cultures, conservation des potentialités génétiques pendant tout le cycle, simplification de la structure lors du passage en phase élémentaire, conservation de l'antigénicité et des exigences de milieu.

Les divergences sont au nombre de trois et tiennent, semble-t-il, au développement constamment intra-cellulaire des virus du groupe T. P. L. : il y a, en effet, réversibilité absolue des phases avec ce groupe, conservation de la sensibilité aux antibiotiques et persistance complète du pouvoir pathogène; avec les bactéries, au contraire, le pouvoir pathogène disparaît ordinairement en phase élémentaire, pendant laquelle on voit également se modifier la sensibilité aux antibiotiques, la réversibilité des phases étant, le plus souvent, impossible à obtenir.

16° L'individualité de la « transformation R » des gros virus est encore plus grande par rapport à la « transformation L » des bactéries si on considère la signification du passage en phase élémentaire : avec les bactéries, le passage en phase élémentaire se produit, en effet, dans des conditions de culture relativement défavorables alors qu'on l'observe avec les virus du groupe T. P. L. dans les milieux cellulaires les mieux adaptés à la culture.

BIBLIOGRAPHIE

I. - BIBLIOGRAPHIE GENERALE

1. BANG F. B. — « Morphology of viruses » (*Ann. Rev. Microb.*, 1955, IX, 21-44).
2. BEDSON S. P. et BLAND J. O. W. — « Morphological study of psittacosis virus, with description of a developmental cycle » (*Brit. J. Exp. Path.*, 1932, 13, 461-466).
3. BEDSON S. P. et GOSTLING J. V. T. -
(*Brit. J. Exp. Path.*, 1954, 35, 299).
4. BLAND J. O. W. et CANTI R. G. — « Growth and development of psittacosis virus in tissue cultures » (*J. Path. Bact.*, 1935, 40, 231-241).
5. COLES A. C. — « Microorganisms in psittacosis » (*Lancet*, 1930, 1, 1011-1012).
6. FINDLAY G. M., MACKENZIE R. D. et Mac CALLUM F. O. — « A morphological study of the virus of lympho-granuloma inguinale (climatic bubo) » (*Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1938, 32, 183-188).
7. HALBERSTAEDTER L. in *Prowazek's Handbuch der Pathogenen Protozoen*. Leipzig, 1912.
8. HALBERSTAEDTER L. et V. PROWAZEK S. — « Über Zelleinschlüsse parasitärer Natur Beim Trachom » (*Arb. k. Gsndtsamte*, 1907, 26, 44-47).
9. HALBERSTAEDTER L. et V. PROWAZEK S. — « Ueber Chlamydozoen — befunde bei Blennorrhoea neonatorum non gonorrhoeica » (*Berl. Klin. Wchnschr.*, 1909, 46, 1839-1840).
10. HERZBERG. — *Zentralbl. Bakt.*, 1940, 46, 177.
11. HERZOG H. — *V. Graefes Arch. Ophth.*, 1910, 74, 520.
12. KUROTCHKIN T. J., LILLY R. L., GAGNON E. et COX H. R. - « Size and morphology of the elementary bodies of the psittacosis-lymphogranuloma group of viruses » (*J. Immunol.*, 1947, 55, 283-287).
13. LAZARUS A. S. et MEYER K. F. - - « The virus of psittacosis. I. Propagation and developmental cycle in egg membrane. Purification and Concentration » (*J. Bact.*, 1939, 38, 121-151).
14. LÉPINE P. — Communication personnelle.
15. LEVINTHAL W. — « Die Ätiologie der Psittacosis » (*Klin. Wchnschr.*, 1930, 9, 654).
16. LEVINTHAL W. — « Recent observations in Psittacosis » (*Lancet*, 1935, 1, 1207-1210).

17. LILLIE R. D. — « Psittacosis : Rickettsia-like inclusions in man and in experimental animals » (*Publ. Health Rep.*, 1930, 45, 773-778).
18. LINDNER K. — Die Freie Initialforme der Prowazekscher Einschlüsse » (*Arch. F. Opht.*, 1910, 76, 559-567).
19. LINDNER K. — « Zur Ätiologie der gonokokkenfreien Urethritis » (*Wien. Klin. Wchnschr.*, 1910, 23, 283-284).
20. MAURO. — *Bull. S. Ital. Soc. Int. Microb.*, 1937, 10.
21. MEYER K. F. in RIVERS (voir plus loin).
22. MIYAGAMA Y., MITAMURA J., YAOI H., ISHII N. et OKANISHI J. — « Studies on virus of lymphogranuloma inguinale Nicolas. Favre and Durand » (*J. Exp. Med.*, 1935, 13, 331-339 et 723-750).
23. PIECHAUD M. — « La coloration sans hydrolyse du noyau des bactéries » (*Ann. Inst. Pasteur*, 1954, 86, 787-792).
24. RAKE G. et JONES H. P. — « Studies on lymphogranuloma venereum. I. Development of the agent in the yolk-sac of the chicken embryo » (*J. Exp. Med.*, 1942, 75, 323-338).
25. RICE C. E. — « The carbohydrate matrix of the epithelial cell inclusion in Trachoma » (*Amer. J. Opht.*, 1936, 19, 1-8).
26. RIVERS T. M. — *Viral and Rickettsial Infections of Man*. J. B. Lippincot Co Ed., Philadelphie, 1952 (2^e édition).
27. THYGESON P. et MENGERT W. F. — « The virus of Inclusion conjunctivitis » (*Arch. Opht.*, 1936, 15, 377-409).
28. THYGESON P. — « The etiology of inclusion Blennorrhoea » (*Amer. J. Opht.*, 1934, 17, 1019-1035).
29. Van ROOYEN C. E. et RHODES A. J. — *Virus Diseases of Man* (Nelson Ed., New-York, 1948).
30. WEISS E. — « The extra-cellular development of agents of psittacosis-lymphogranuloma group (Chlamydozoaceae) » (*J. Infect. Dis.*, 1949, 84, 125-149).
31. WENNER H. A. — « Psittacosis-Lymphogranuloma group of viruses » (*Advances in virol. Res.*, 1958, V, 40 à 93).
32. YANAMURA H. Y. et MEYER K. F. — « Studies on the virus of psittacosis cultivated in vitro » (*J. Infect. Dis.*, 1941, 68, 1-15).

II. — BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE AYANT TRAIT AU SUJET TRAITE

33. « Le virus de l'avortement de la brebis. Premier isolement en France. Mise au point d'un procédé microscopique rapide de diagnostic », en coll. avec P. GIROUD, F. ROGER et A. VALLÉE (*Bull. Acad. Vét.*, 1956, XXIX, 393-401).
34. « Quelques remarques sur le développement des virus du groupe

- de la psittacose », en coll. avec F. ROGER (*Ann. Inst. Pasteur*, 1958, 94, 128-131).
35. « Les affinités tinctoriales des rickettsies et des gros virus visibles (Gr. lymphogranulomatoso-psittacose). I. Sur le mécanisme de la différenciation avec la coloration de Macchiavello et sur quelques applications pratiques », en coll. avec F. ROGER (*Ann. Inst. Pasteur*, 1958, 94, 126-128).
36. « Les affinités tinctoriales, etc. II. Sur la signification biologique de la coloration de Macchiavello », en coll. avec F. ROGER (*Ann. Inst. Pasteur*, 1958, 94, 230-232).
37. Les affinités, etc. III. La coloration de Giemsa. Sur sa signification anatomique et biologique », en coll. avec F. ROGER (*Ann. Inst. Pasteur*, 1958, 94, 233-235).
38. « Le virus de l'avortement de la brebis. Son pouvoir pathogène pour le névraxe. Sa parenté avec le virus lymphogranulomateux, en coll. avec F. ROGER (*Ann. Inst. Pasteur*, 1958, 94, 379-383).
39. « L'infection de la brebis par le virus de l'avortement. Reproduction expérimentale de la maladie », en coll. avec F. ROGER, P. FAYE et A. VALLÉE (Données non publiées).
40. « Les corps élémentaires des virus visibles constituent de véritables équivalents « L » des microorganismes rickettsiens. Le retour à la phase rickettsienne des cultures le démontre péremptoirement », en coll. avec F. ROGER (*Ann. Inst. Pasteur*, 1958, 94, 521-525).
41. « Affinités tinctoriales des Rickettsies ». 4° Colorabilité de *R. Burneti* après agitation en présence d'éther », en coll. avec F. ROGER et J. GIUNTINI (*Ann. Inst. Pasteur*, 1958, 94, 663-666).
42. « La phase rickettsienne des virus du groupe Psittacose-lymphogranulomatoso et son mécanisme de division », en coll. avec F. ROGER (*Ann. Inst. Pasteur*, 1958, 94, 667-669).
43. « Une variante simple d'emploi du colorant de Wright utilisable avec les rickettsies et les virus de groupe Trachome-Psittacose-Lymphogranulomatoso », en coll. avec F. ROGER (*Bull. Soc. Path. Exot.*, 1958, 51, 307-309).
44. « Contribution microscopique à l'étude cytologique des virus du groupe Trachome-Psittacose-Lymphogranulomatoso (*Bull. Soc. Path. Exot.*, 1958, 51, 480-484).

Conception classique du « cycle évolutif obligatoire » (coloration : « Wright, procédé A »).

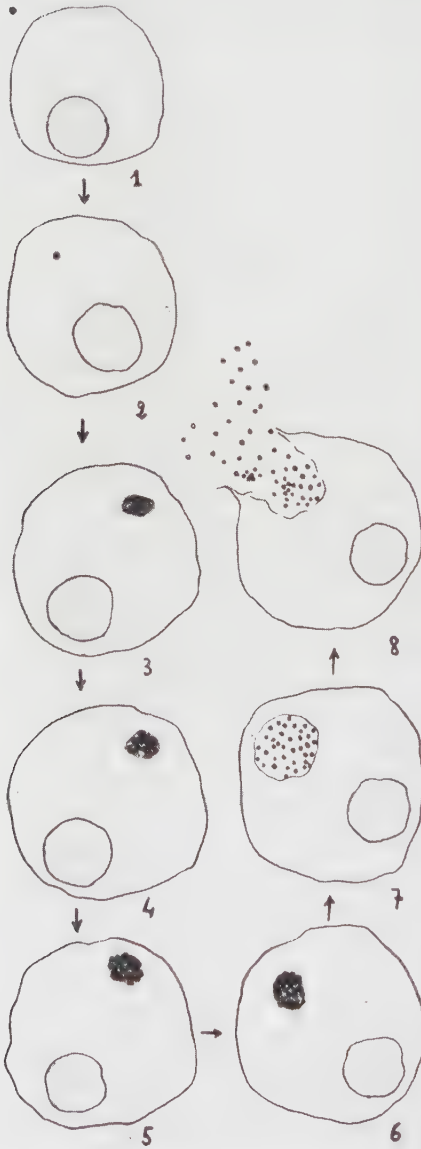
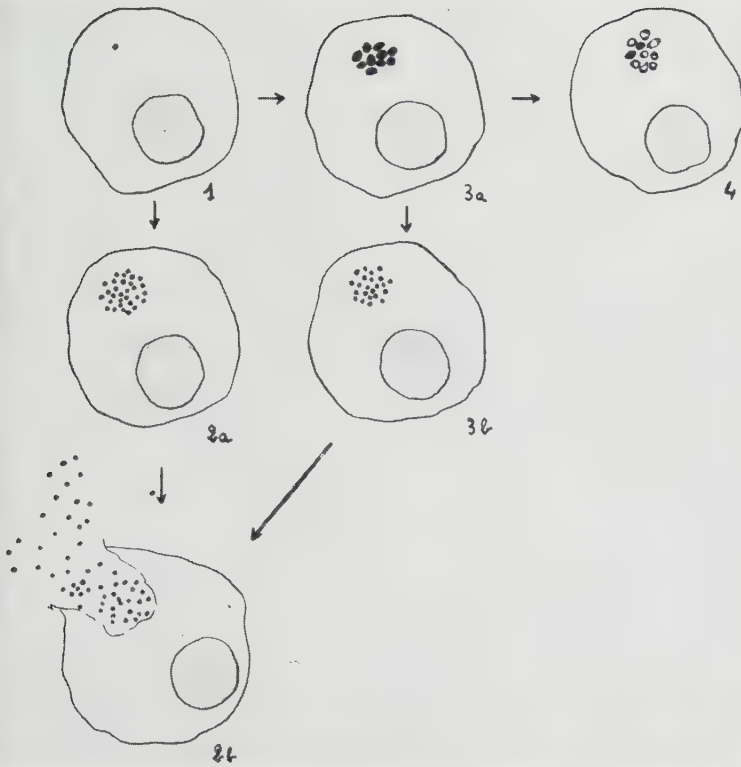


PLANCHE I



Conception « adaptative » de la morphologie des virus du groupe T. P. L., selon Levinthal (coloration « Wright, Procédé A »).

- 1° Corps élémentaire aussitôt après sa pénétration à l'intérieur d'une cellule.
- 2° Evolution du virus dans une cellule peu résistante (évolution théoriquement possible mais non démontrée par Levinthal).
 - a) Multiplication exclusive sous forme de corps élémentaire.
 - b) Libération des corps élémentaires par rupture cellulaire.
- 3° Evolution des corps élémentaires dans une cellule initialement peu adaptée à la culture.
 - a) Stade initial : formation des corps initiaux.
 - b) Stade terminal : multiplication sous forme de corps élémentaires.
- 4° Evolution en cul-de-sac des corps initiaux : naissance des formes d'involution ou de dégénérescence (éléments bipolaires, en anneau, etc.).

Conception personnelle de l'évolution des virus du groupe T. P. L. (théorie de l'adaptation morphologique et du cycle facultatif).

(Coloration « Wright, Procédé A »)

- 1° Élément infectant quelconque (et pas seulement C. E.).
- 2° Pénétration intracytoplasmique de l'élément infectant.
- 3° Première évolution possible (éléments inaptes à se multiplier).
 - a) Formation d'une gangue stérile, basophile.
 - b) Evolution acidophile de la gangue (cas des monocytes).
- 4° Deuxième évolution possible : multiplication sous forme de corps élémentaires violets (cellules alvéolaires du poumon de souris).
- 5° Troisième évolution possible : le cycle facultatif par variation continue des conditions de culture sous l'influence du virus (cellule entoblastique de la membrane vitelline).
 - a) Corps initiaux (600 m μ).
 - b) Apparition des corps initiaux bleutés (700 m μ).
 - c) Phase de polymorphisme.
 - d) Apparition des corps élémentaires bleutés à l'intérieur de la colonie de corps polymorphes.
 - e) Apparition des corps élémentaires violets.
 - f) Colonie terminale de corps élémentaires violets.
- 6° Deux cas particuliers avec « blocage » du cycle morphologique à l'un des stades évolutifs mais continuation de la culture.
 - a) Blocage au stade de polymorphisme maximum.
 - b) Blocage en phase rickettsienne typique (Souche « Compiègne 56 » d'avortement sur chorio-allantoïde).

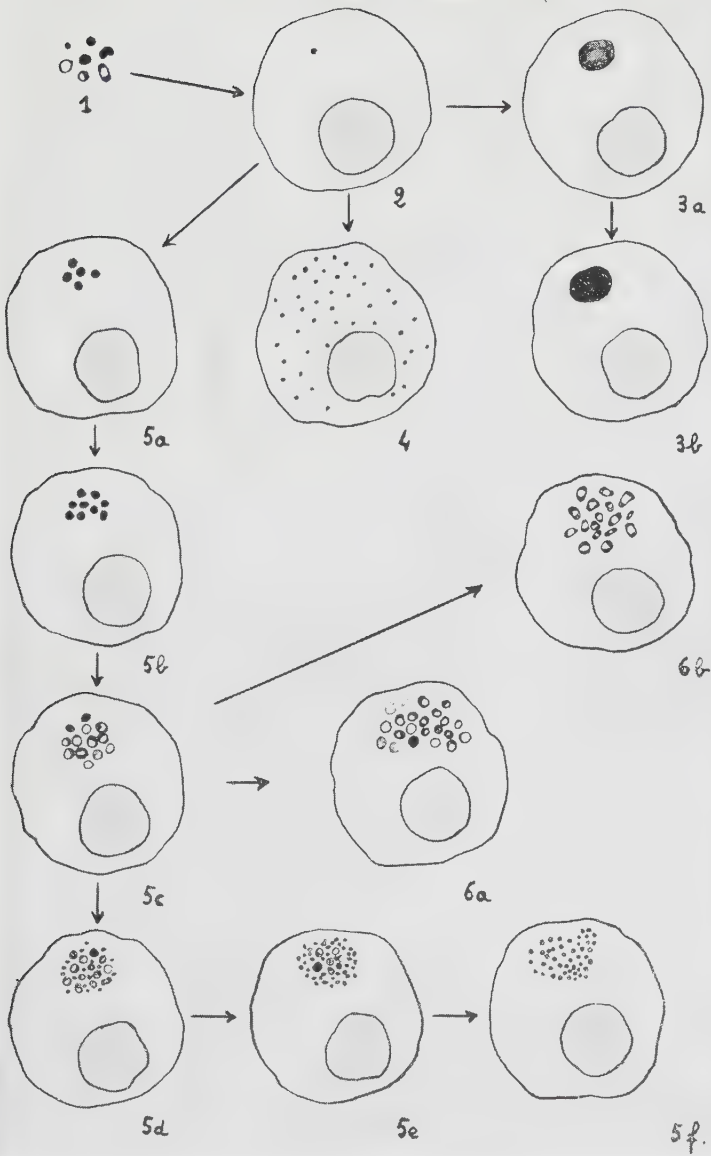


PLANCHE III

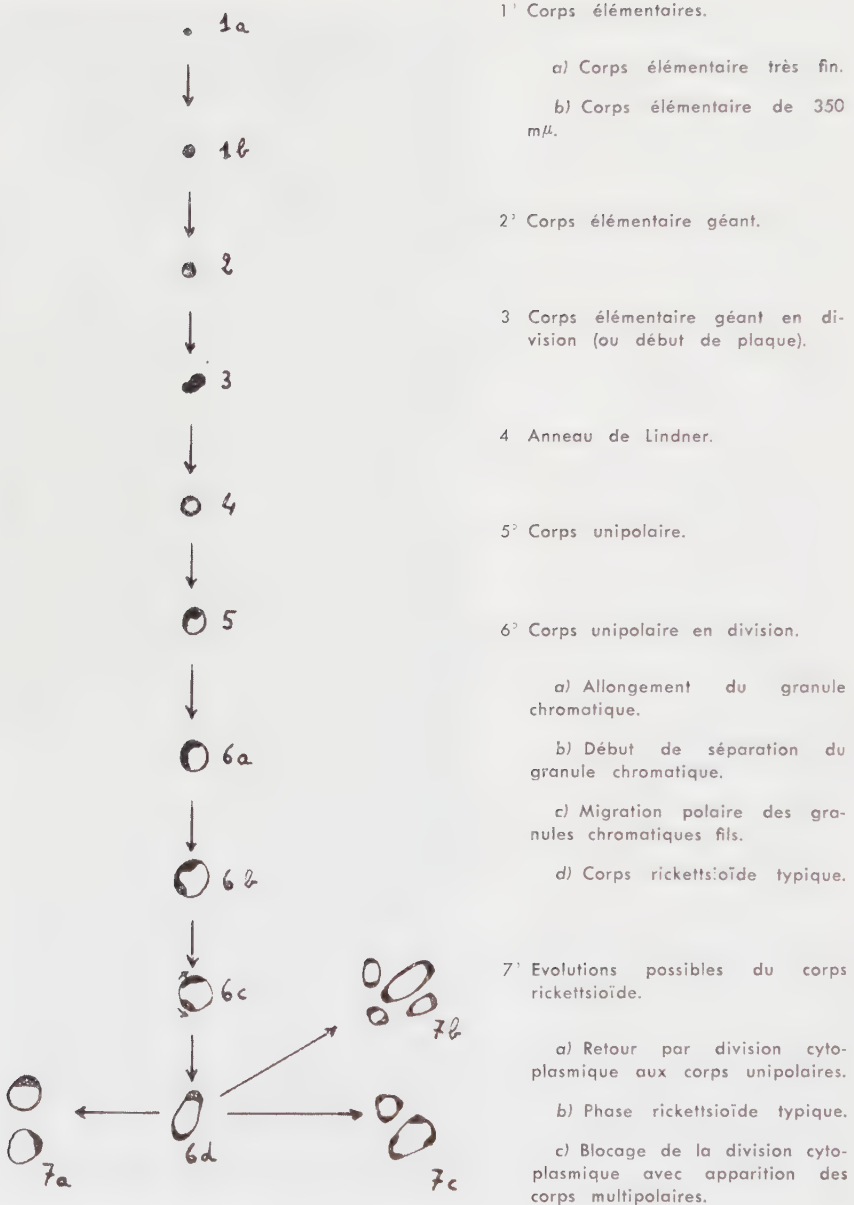


PLANCHE IV

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION HISTORIQUE	7
-------------------------------	---

PREMIÈRE PARTIE

MATERIEL ET METHODES

A) Les souches	15
B) Procédés de culture	18
1° La souris inoculée par voie nasale	19
2° Inoculation dans le péritoine de la souris	20
3° Inoculation dans l'espace arachnoïdien de la souris ...	20
4° Le sac vitellin de l'œuf	22
5° Le sac allantoïque de l'œuf	22
6° L'épithélium chorial de l'œuf	23
C) Techniques de microscopie	25
1° Préparations	25
2° Caractéristiques du microscope	25
3° Procédés de coloration	26
a) Préparation des solutions de colorant	26
b) Utilisation de la solution extemporanée	27
— <i>Lesprocédés topographiques simples</i>	27
α Procédé A	27
β Procédé R	28
— <i>Procédés cytochimiques</i>	30
α Test de Brachet à la Ribonucléase	31
β Technique de Piékariski-Robinow	31

DEUXIÈME PARTIE

LES DONNEES MORPHOLOGIQUES IMMEDIATES

A) Définition et description des particules élémentaires ..	35
1° Corps élémentaires	35

a) Les plus fins	35
b) Corps élémentaires de 350 m μ	35
c) Corps élémentaires géants	35
2° Corps polymorphes	36
a) Corps unipolaires	36
b) Corps bipolaires	37
c) Corps multipolaires et plaques	38
B) Groupement des particules élémentaires	39
1° Formes isolées des frottis	39
2° Colonies	39
a) Colonies vacuolaires	40
b) Colonies matricielles	40
c) Colonies à gangues	40

TROISIÈME PARTIE

PROBLEMES D'INTERPRETATION

A) Déterminisme de la formation des gangues	45
B) Déterminisme des différents types morphologiques	49
1° Nature des particules de virus spontanément libérées par les cellules	50
2° Essai d'obtention de particules homogènes	50
a) Culture pure des corps élémentaires	52
b) Culture pure des corps élémentaires géants	53
c) Culture pure des corps rickettsioides	53
3° Capacités infectantes des trois types morphologiques obtenus en culture pure	53
4° Capacités infectantes des formes intra-cellulaires exclu- sives	54
5° Subculture indéfinie des types morphologiques homo- gènes	56
6° Facteurs de contrôle des divers types morphologiques ..	57
a) Influence du milieu cellulaire de culture	57
Facteur tissulaire	58
Facteur individuel	58
— Facteur chronologique	59
b) Variation dans l'aptitude au polymorphisme selon les souches	59

C) Les mécanismes de la division des gros virus. Leur relation avec les phases	61
1° Division des virus du groupe T.P.L. en phase élémentaire	62
2° Division en phase rickettsienne typique	63
3° Signification des phénomènes observés au cours des deux phases	65
4° Structure des autres types de particules virulentes	67
a) Les formes unipolaires	67
b) Formes multipolaires	67
D) Le problème de la succession des phases et de leur articulation	68
1° Articulation des éléments virulents pourvus d'un cytoplasme	68
2° Articulation des éléments à cytoplasme négligeable	68
3° Passages des types morphologiques pourvus d'un cytoplasme aux types morphologiques à cytoplasme négligeable	69

QUATRIÈME PARTIE

DISCUSSION

A) Signification des variations morphologiques des virus du groupe T. P. L.	75
B) Signification du « cycle facultatif » des gros virus	77
C) Comparaison entre les phases des virus du groupe T.P.L. et les variations morphologiques de quelques autres microorganismes	78
1° Comparaison avec le groupe des Rickettsies	79
2° Comparaison avec les germes du groupe de la péripneumonie	80
3° Les phases morphologiques des bactéries et les phases morphologiques des gros virus	81
a) Définition et description des transformations morphologiques des bactéries	81
b) Rapports mutuels des types morphologiques bactériens	82
c) Analogies et différences entre la transformation L des bactéries et la transformation R des gros virus..	83

— Analogies (antigénicité, exigences de culture) ..	83
— Divergences (pouvoir pathogène, sensibilité aux antibiotiques, réversibilité des phases, signification de l'apparition des corps élémentaires)	83

RESUME ET CONCLUSION	87
----------------------------	----

BIBLIOGRAPHIE

1° Bibliographie générale	97
2° Bibliographie personnelle	98

Planche I	100
Planche II	101
Planche III	103
Planche IV	104

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

La fluorescence appliquée à l'étude des antigènes
et des anticorps

Vu et approuvé :

Paris, le 2 Juin 1960

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS

Vu

et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH

ACHEVE D'IMPRIMER
EN OCTOBRE 1962
SUR LES PRESSES DE J. PEYRONNET et C^{ie}
IMPRIMEURS-EDITEURS
8, RUE DE FURSTENBERG, PARIS-6^e
Ateliers de Joigny (Yonne)

C. O. L. 31.0086

